

**Naturstoffscreening und Bioprozeßoptimierung der
Wirkstoffproduktion eines marinen schwammassoziierten
Bakteriums**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von
Marén Hüners
aus Uelzen

1. Referentin: PD Dr. U. Bilitewski
2. Referent: Prof. Dr. D.C. Hempel

eingereicht am: 10. Mai 1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 15. Juli 1999

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

- Hüners, M., Müller, W.E.G., Bilitewski, U., and Lang, S., Screening for Bioactive Natural Products of Marine Microorganism Associated with Sponges. In: BIOSpektrum, Sonderausgabe/VAAM-Tagung Frankfurt 1998, S. 74
- Hüners, M., Bilitewski, U., und Lang, S., Kultivierung eines marinen *Pseudoalteromonas* sp. aus dem Schwamm *Crella rosea* zur Produktion biologisch aktiver Substanzen. In: Kurzfassungen DECHEMA-Jahrestagungen'99, Band 1, Wiesbaden, 27.-29.04.1999, S. 182

Tagungsbeiträge:

- Hüners, M., Müller, W.E.G., Bilitewski, U., und Lang, S., Screening nach bioaktiven Naturstoffen aus marinen Mikroorganismen assoziiert mit Schwämmen. (Poster) VAAM-Tagung Frankfurt 22.-25.03.1998
- Lang, S., Hüners, M., Müller, W.E.G., Wray, V., Nimtz, M., and Wicke, C., Bioactive Natural Products from Marine Bacteria Associated with Sponges. (Vortrag) Wilhelmshaven 19.07.1998
- Hüners, M., Bilitewski, U., und Lang, S., Kultivierung eines marinen *Pseudoalteromonas* sp. aus dem Schwamm *Crella rosea* zur Produktion biologisch aktiver Substanzen. (Vortrag) DECHEMA-Jahrestagung Wiesbaden, 27.-29.04.1999

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Universität Braunschweig unter der Leitung von Herrn PD Dr. Siegmund Lang angefertigt.

Für die angebotenen Arbeitsmöglichkeiten, die stete Diskussionsbereitschaft und das große Interesse an dieser Arbeit bedanke ich mich besonders bei Herrn PD Dr. Siegmund Lang.

Frau PD Dr. Ursula Bilitewski danke ich für die Übernahme des Hauptreferates dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dietmar-Christian Hempel danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Für die Organisation des Forschungsaufenthaltes am Institut Ruder Boskovic für Meeresbiologie der Universität Zagreb und für die Probenbeschaffung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. W. E. G. Müller bedanken.

Bei der Stammidentifizierung waren die Beiträge von Herrn Ivo Prokic (Uni Mainz), Herrn Dr. Rüdiger Pukall (GBF Braunschweig) und Herrn Dr. Heinrich Lünsdorf (GBF, Braunschweig) sehr wertvoll. Ich möchte mich für die Zusammenarbeit bedanken.

Frau Martina Weiss von der Uni Hannover danke ich für die schnelle und unproblematische Durchführung der Aminosäureanalytik.

Für die Durchführung verschiedener biologischer Aktivitätstests möchte ich mich bei folgenden Firmen und Instituten bedanken: Inst. f. Physiologische Chemie, Uni Mainz; Fa. Merz + Co., Frankfurt; Inst. f. Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig; KTB Tumorforschung GmbH, Freiburg; Fraunhofer Institut, Hannover.

Herrn Detlef Rasch danke ich für die Fotodokumentationen und für viele wertvolle Tips. Seine Hilfsbereitschaft bei allen technischen Problemen hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Lang für das nette Arbeitsklima, insbesondere den Kolleginnen Frau Dipl.-Chem. Elke Vollbrecht und Frau Dipl.-Chem. Corinna Wicke, die gleichzeitig mit mir ihre Dissertationen anfertigten. Bei Frau Dipl.-Chem. Corinna Wicke möchte ich mich außerdem noch für die gute Zusammenarbeit in OO1 bedanken. Der nachfolgenden Generation Herrn Dipl.-Chem. Werner Ramm und Herrn Dipl.-Biotechnologe Olaf Langer wünsche ich für die Zukunft viel Erfolg.

Zum Schluß gilt mein besonderer Dank noch Dr. Torsten Buch, der mir durch seine vielfältigen Unterstützungen während der ganzen Zeit eine große Hilfe war.

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	9
1. Chemikalien	9
1.1 Chemikalien für Nährmedien	9
2. Mikroorganismen für spezielle Tests	9
3. Nährmedien	10
3.1 Marine Broth (MB)	10
3.2 Nutrient Broth (NB)	10
3.3 Malz-Pepton-Hefeextrakt (MPY)	10
3.4 Algen-Medium (CP)	11
3.5 <i>Vibrio fischeri</i> -Medium (VF)	11
4. Gewinnung von Bakterien aus Schwämmen	11
5. Stammhaltung und Konservierung	12
5.1 Stammkulturen	12
5.2 Konservierung in Glycerin	12
5.3 Konservierung in flüssigem Stickstoff	12
6. Charakterisierungsmethoden für Bakterien	13
6.1 Morphologische Charakterisierungsmethoden	13
6.1.1 Mikroskopie	13
6.1.2 KOH-Test	13
6.1.3 Elektronenmikroskopie	14
6.2 Physiologische Charakterisierungsmethoden	14
6.2.1 Oxidasetest	14
6.2.2 BBL Oxi/Ferm Tube II	14
6.2.3 BBL Enterotube II	15
6.2.4 BBL Crystal	15
6.3 Phylogenetische Charakterisierungsmethoden	15
6.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
7. Tests biologischer Aktivitäten	17
7.1 Antimikrobielle Aktivitätstests	17
7.1.1 Overlaytest	17
7.1.2 Plättchentest	17
7.1.3 Dünnschichtchromatographie-Overlaytest	18
7.1.4 Röhrchentest	19
7.1.5 Produktbestimmung mittels Plättchentest	20
7.2 Biolumineszenztest	20
7.3 Externe Aktivitätstests	22

7.3.1	Zytotoxische Aktivitäten	22
7.3.2	Neuroprotektive Aktivitäten	23
7.3.3	Nematozide Aktivitäten	23
7.3.4	Hemmung und Aktivierung von Proteinkinasen	23
8.	Kultivierungen im Schüttelkolben	24
8.1	Vorkultur	24
8.2	Hauptkultur	24
9.	Kultivierungen im Bioreaktor	25
9.1	Vorkultur	25
9.2	10 l und 50 l Bioreaktor	25
10.	Kultivierungsparameter	27
10.1	Zelldichte	27
10.2	Biotrockenmasse	27
10.3	Abgasanalyse	27
10.4	Wachstumsrate	29
11.	Analytik	29
11.1	Bestimmung der Glukosekonzentration	29
11.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	29
11.2.1	Zellaufschluß	29
11.2.2	Proteinbestimmung	30
11.3	Bestimmung der Ammoniumkonzentration	31
11.4	Bestimmung der Stickstoffkonzentration	32
11.5	Bestimmung der Phosphatkonzentration	32
11.6	Bestimmung der Aminosäurekonzentration	32
12.	Aufreinigung von Metaboliten	33
12.1	Extraktion	33
12.2	Chromatographische Trennung	33
12.2.1	Säulenchromatographie	33
12.2.2	Dickschichtchromatographie	33
13.	Analytische Methoden zur Struktur von Metaboliten	34
13.1	Produktkontrolle mittels Dünnschichtchromatographie	34
13.2	NMR-Spektroskopie	35
13.3	Gaschromatographie/Massenspektroskopie	35
13.4	Massenspektroskopie	35
13.5	FAB-Massenspektroskopie	36
13.6	IR-Spektroskopie	36

ERGEBNISSE 37

1.	Screening	37
1.1	Isolierung von schwammassoziierten Bakterien (Rovinj 1996)	37
1.2	Screening I nach biologisch aktiven Kulturextrakten	38
1.3	Isolierung von Bakterien aus dem Schwamm <i>Crella rosea</i> und seiner natürlichen Umgebung (Rovinj 1997)	39

1.4	Screening II nach biologisch aktiven Kulturextrakten	41
1.4.1	Antimikrobielle Metabolite	41
1.4.2	Toxische Metabolite	42
2.	Bakterienisolat Mt 5.1 aus dem Schwamm <i>Mycale tunicata</i>	43
2.1	Charakterisierung des Bakteriums Mt 5.1	43
2.2	Strukturaufklärung und Wirkung der biologisch aktiven Substanz	44
3.	Bakterienisolat MH-Cr 6.3 aus dem Schwamm <i>Crella rosea</i>	49
3.1	Charakterisierung des Bakteriums MH-Cr 6.3	49
3.1.1	Morphologische Charakterisierung	49
3.1.2	Physiologische und biochemische Charakterisierung	51
3.1.3	Phylogenetische Charakterisierung	52
3.1.4	Vergleich von MH-Cr 6.3 mit <i>P. piscicida</i> und <i>P. rubra</i>	55
3.2	Charakterisierung der antimikrobiellen Substanzen	57
3.3	Charakterisierung weiterer Metabolite des Produktspektrums	62
4.	Charakterisierung des Wachstumsverhalten von <i>Pseudoalteromonas</i> spec. MH-Cr 6.3	71
4.1	Kultivierung in Marine-Broth-Medium	71
4.1.1	Kultivierung im Schüttelkolben	71
4.1.2	Kultivierung im 50 l Bioreaktor	72
4.2	Optimierung des Wachstums von MH-Cr 6.3	74
4.2.1	Abhängigkeit des Wachstums von der NaCl-Konzentration	75
4.2.2	Einfluß verschiedener C-Quellen	77
4.2.3	Einfluß verschiedener N-Quellen	78
4.2.4	Optimierung der Mediumszusammensetzung	80
4.2.5	Optimierung der Wachstumstemperatur	82
4.2.6	Optimierung der Begasungsrate	84
4.3	Kultivierung im 50 l Bioreaktor unter optimierten Bedingungen	86
4.4	Fed-Batch-Kultivierung im Bioreaktor	89

DISKUSSION **93**

1.	Screening	93
2.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> aus dem Schwamm <i>Mycale tunicata</i>	98
3.	<i>Pseudoalteromonas</i> spec. MH-Cr 6.3 aus dem Schwamm <i>Crella rosea</i>	99
3.1	Charakterisierung des Bakteriums	99
3.2	Charakterisierung der antimikrobiellen Substanzen	101
3.3	Charakterisierung weiterer Metabolite	107
3.4	Wachstum und Metabolismus von MH-Cr 6.3	110
3.5	Optimierung des Wachstums und der Wirkstoffproduktion	116

ZUSAMMENFASSUNG **126**

LITERATUR	128
------------------	------------

ANHANG	139
---------------	------------

1. Abkürzungsverzeichnis	139
2. Nukleotidsequenz von MH-Cr 6.3	141

I. Einleitung

Da heute von mehr als 30.000 bekannten Krankheitsbildern nur etwa ein Drittel symptomatisch und nur wenige ursächlich behandelt werden können, steht die Suche nach Leitstrukturen für die Entwicklung von neuen hochwirksamen Medikamenten im Mittelpunkt pharmazeutisch- chemischer Unternehmen. Aufgrund der rasanten Fortschritte der Molekularbiologie ist ein stetig wachsender Erkenntnisgewinn über Krankheitsbilder auf molekularer Ebene möglich. Eine wichtige Quelle zur Leitstruktursuche neuer Medikamente bilden Synthetika, die in „Chemischen Bibliotheken“ zur Ausprüfung im Hochdurchsatz-Screening (HTS) zur Verfügung stehen. Eine weitere Ergänzung stellen die in den „Kombinatorischen Bibliotheken“ enthaltenen Substanzen dar, die durch Verknüpfung von Automatisierung und simultaner Synthese erzeugt werden. Die rationale Entwicklung neuer Strukturen konnte jedoch nicht mit der Entwicklung von Modellen und Testsystemen für unterschiedliche Erkrankungen Schritt halten. Ein Ausweg stellt nach wie vor die strukturelle Vielfalt der Naturstoffe dar.

Naturstoffe besitzen gegenüber chemisch-synthetischen Verbindungen den Vorteil, daß sie komplexe Strukturen besitzen, die viel mehr biologische Informationen tragen und synthetisch kaum hergestellt werden können. Sie sind im Laufe der Evolution entwickelt worden, um bestimmte biologische Vorgänge zu beeinflussen. Bereits in früher Zeit wurden Naturprodukte wie z.B. die Weidenrinde (Salicylsäure), die Chinarinde (Chinin) oder der chinesische Beifuß (Artemisinin) zur Therapie von Krankheiten eingesetzt. Ebenfalls durch Zufall wurden Ende der 30er Jahre Mikroorganismen als Sekundärstoffproduzenten von bedeutsamen Medikamenten wie die β -Lactame (Penicillin G) und die Makrolidantibiotika (Erythromycin) entdeckt [Bindseil 1996]. In den letzten Jahren haben Naturstoffe ihren hohen therapeutischen Wert immer wieder unter Beweis gestellt, wie aus den Arzneimittelzulassungen zu ersehen ist. Neben Camptothecin, FK 506 und Acarbose ist Taxol, das aus der Rinde der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*, Oregon) isoliert wurde, eines der vielversprechendsten Zytostatika der letzten 20 Jahre. Es hat bereits gute Therapieerfolge für fortgeschrittene Eileiterkarzinome und maligne Melanome gezeigt [Hartwig & Henkel 1994, Koch & Neumann 1997].

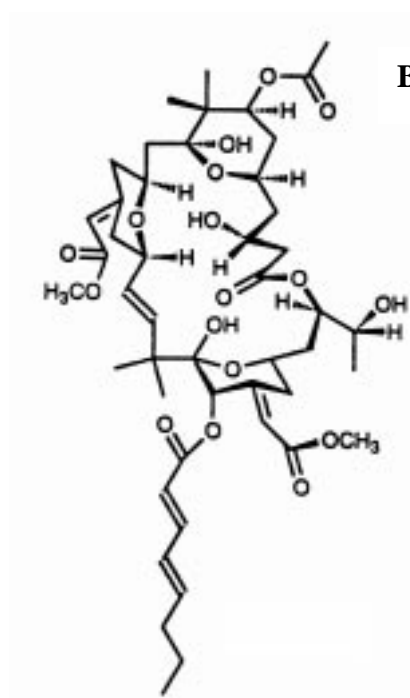
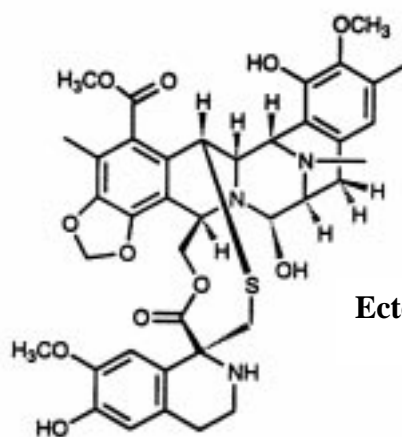
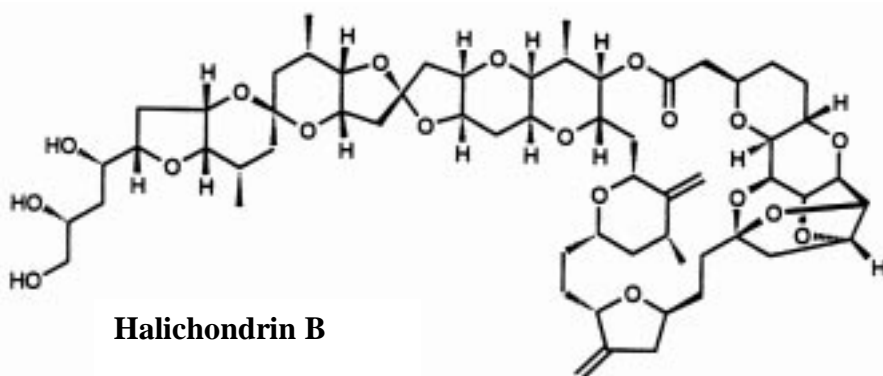
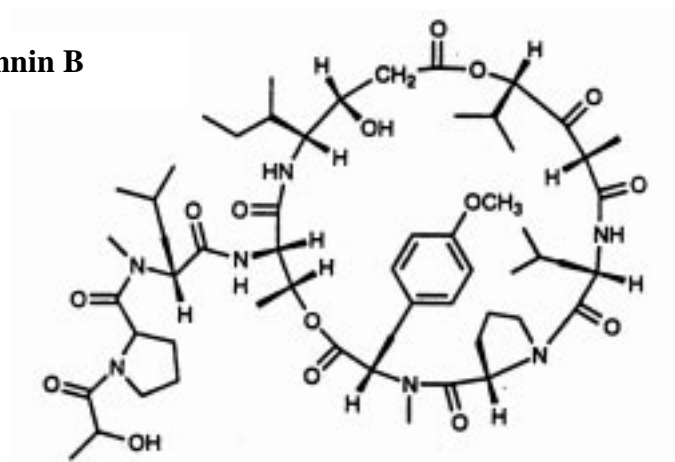
In den letzten Jahren wurde das Augenmerk der Naturstoffforscher immer mehr auch auf die Nutzung mariner Ressourcen als Quelle für neue Wirkstoffe gerichtet.

Die marine Umgebung bietet eine größere Artenvielfalt als der terrestrische Bereich. Das Meer bedeckt 71 % der Erdoberfläche und besteht aus vielen verschiedenen Habitaten, von

Korallenriffen bis hin zu tropischen und arktischen Meeren, heißen Quellen und der Tiefsee. Die Ozeane besitzen aufgrund ihrer hohen Produktivität eine durchschnittliche marine Biomasse, die etwa 20 % über der terrestrischen liegt. Die Biomasse sinkt exponentiell mit der Meerestiefe, während die Diversität der Species ansteigt. Mehr als $3 \times 10^8 \text{ km}^2$ der Meere ist tiefer als 1.000 m mit einigen Bereichen, die eine Tiefe von 10.000 m erreichen. Über 51 % der Meeresflächen ist über 3.000 m tief. Der hydrostatische Druck steigt alle 10 m um 1 bar. Bei einer Meerestiefe von 1.000 m liegt die Temperatur immer zwischen $-1,5$ und $+5^\circ\text{C}$, was bei etwa 90 % des Ozeanvolumens der Fall ist. Im offenen Meer liegt der Salzgehalt zwischen 3,2 und 3,8 % während er in Küstengewässern zwischen 0,1 und 4,4 % variieren kann. Der pH-Wert im Ozeanwasser befindet sich normalerweise zwischen 7,5 und 8,5, Küstengewässer zeigen hingegen eine breitere Varianz. In einigen Bereichen befinden sich geothermale Quellen, die Temperaturen zwischen 300 und 400°C erreichen [deVries & Hall 1994]. Aufgrund ihrer Biodiversität überschreitet die marine Umgebung das Reich der terrestrischen Lebewesen, daher liegt hier das größere Potential bei der Suche nach neuen Wirkstoffen. Marine Naturstoffe zeichnen sich durch ungewöhnliche funktionelle Gruppen aus, insbesondere durch die Substitution mit den Halogenen Chlor und Brom. Weiterhin sind komplexe Heterocyklen, Ringsysteme und Terpenoide weit verbreitet. Viele marine Toxine gehören zur Gruppe der Polyetherverbindungen. Eine Besonderheit sind Peptide und Dipeptide mit teilweise ausgefallenen Aminosäuren [Faulkner 1998].

Inzwischen sind über 6000 Verbindungen aus marinen Organismen beschrieben (Datenbank MARINLIT). Zur Zeit befinden sich die vier marinen Naturstoffe Bryostatin-1, Halichondrin B, Didemnin B und Ecteinascidin 743 in Phase II des klinischen Tests als Antitumormittel (Abb. I.1).

Bryostatin-1, isoliert aus dem Moostierchen *Bugula neritina*, ist ein makrocyclisches Lacton, das durch Bindung an die Proteinkinase C Antitumorwirkung besitzt. Mittlerweile sind mehr als zwanzig verschiedene Bryostatine bekannt, die sich lediglich in den Säureresten unterscheiden. Aufgrund der niedrigen Konzentration im Ausgangsmaterial von 10^{-8} bis $10^{-3} \%$ werden 500 bis 1000 kg Bryozoen benötigt, um einige Milligramm Substanz zu isolieren. 1988 wurden 18 g Bryostatin-1 aus 10.000 Gallonen Bryozoen (40.000 l) an der südkalifornischen Küste für die klinischen Untersuchungen isoliert. Inzwischen ist die Biotechnologie-Firma CalBioMarine Technologies (Carlsbad, California) dabei, Kolonien von *B. neritina* in 5000 Liter-Tanks zu kultivieren, um den Nachschub zu sichern [König & Wright 1998b].

**Bryostatin-1****Ecteinascidin 743****Halichondrin B****Didemnin B****Abb. I.1:** Marine Naturstoffe

Halichondrin B ist ein Polyethermacrolid und wurde aus verschiedenen Schwämmen unter anderem auch aus *Halichondria okadai* isoliert.

Bereits Ende der sechziger Jahre wurde die antineoplastische Wirkung von Ecteinascidin-743, isoliert aus dem Extrakt des Manteltieres *Ecteinascidine turbina*, entdeckt. Erst 1990 gelang Rinehart die vollständige Strukturaufklärung des trimeren Tetrahydroisochinolinalkaloids [Rinehart *et al.* 1990]. Die Versuche in Aquakultur konnten inzwischen soweit optimiert werden, daß der volle Entwicklungszyklus des Tieres im Aquarium abläuft und somit der Substanzbedarf vorläufig gedeckt ist. Eine chemische Synthese dieses Naturstoffes bietet jedoch eine echte Alternative zur Isolierung.

Ein weiteres Tier dieser taxonomischen Gruppe, *Trididemnum solidum*, liefert die Didemnine. Hierbei handelt es sich um ein Depsipeptid, das die untypische Aminosäure Isostatin enthält und neben Peptidbindungen auch Esterbindungen aufweist. Didemn B war der erste marine Naturstoff in Phase II der klinischen Forschung [König & Wright 1998b].

Zu den neuesten Entdeckungen gehört das Protein Cyanovirin-N, das aus dem Cyanobakterium *Nostoc elliposporum* isoliert wurde und eine Molmasse von 11 kDa besitzt. Durch irreversible Wechselwirkung von Cyanovirin-N mit dem auf der HIV-1-Oberfläche lokalisierten gp120 wird die Bildung von Virus-Zell-Kontakten verhindert. Das Molekül kann inzwischen rekombinant durch Fermentation mit *E. coli* in ausreichender Menge hergestellt werden [Lindel 1998].

Im marinen Habitat sind wirbellose Tiere (Invertebraten) wie Schwämme, Moostierchen, Seescheiden etc. die bedeutensten Naturstoffproduzenten und übertreffen Makrophyten sowohl in der Anzahl als auch in der Diversität der gefundenen Strukturen. Das Vorkommen biologisch aktiver Naturstoffe in Invertebraten ist auf chemische Schutzmechanismen zurückzuführen, die diesen sessilen und morphologisch wehrlosen Organismen das Überleben sichern. Durch die Produktion von bioaktiven Molekülen werden Bakterien, Einzeller und Viren in ihrem Wachstum und der Vermehrung gehemmt und auch größere Lebewesen wie Schnecken, Würmer, Arthropoden, Stachelhäuter und sogar Fische als Fraßfeinde abgeschreckt. Die Schwämme sind unter den Meeresorganismen einer der reichhaltigsten Produzenten von Naturstoffen, sowohl in Hinblick auf die Vielfalt der chemischen Strukturen als auch an biologischen Eigenschaften. Es wurden bereits Substanzen mit zytotoxischen, antibakteriellen, antiviralen, fungiziden, antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften isoliert [Faulkner 1984, Sears *et al.* 1990]. Neben dem 1986 beschriebenen

Avarol aus dem Schwamm *Dysidea avara* [Müller *et al.* 1986], das aufgrund seiner wachstumsinhibierenden Wirkung auf HIV-1 Aufmerksamkeit erregte, gehören zu den neueren Entdeckungen z.B. die Plakoside (aus *Agelas* sp.) mit immunsuppressiver Wirkung und Crellastatine (aus *Crella* sp.) mit zytotoxischer Wirkung [Lindel 1998].

Die meisten Invertebraten leben sowohl von Bakterien und Mikroalgen, die sie phagozytieren, als auch in enger Assoziation mit Mikroorganismen die extra- und intrazellulär vorkommen. Im Falle des Schwammes *Verongia aerophoba* machen die Fremdorganismen bis zu 40 % der Biomasse aus. Es stellt sich hier die Frage, wer der eigentliche Produzent der Wirkstoffe ist, der Schwamm oder die Bakterien. Beispiele zeigen, daß einerseits Substanzen mit einfachen Strukturen aus verschiedenen Schwammspecies und andererseits aus Schwämmen der gleichen Species verschiedene Metabolite isoliert wurden. Einige Beispiele demonstrieren die Problematik bei der Ermittlung des Metabolitproduzenten [Faulkner *et al.* 1993]. Im Fall der Okadainsäure aus *Halichondria okadai* ist bewiesen, daß der eigentliche Produzent der Dinoflagellat *Prorocentrum lima* ist, der über die Nahrungskette in den Schwamm gelangt [Proksch & Schupp 1996].

Die Anpassung eines Lebewesens an eine veränderte Umgebung ist für sein Überleben erforderlich. Meist resultiert daraus die Produktion von Sekundärmetaboliten. Aufgrund der metabolischen Vielfalt bei Bakterien, der kurzen Generationszeit und der schnellen Anpassung an veränderte Umweltbedingungen, stellen sie eine interessante Quelle bei der Naturstoffsuche dar. Die Anpassung des Wachstums mariner Mikroorganismen im Vergleich zu terrestrischen ist sehr unterschiedlich, da das Nährstoffangebot im Meer sehr knapp ist und viele Mikroorganismen daher assoziiert mit den nährstoffreichen Pflanzen und Tieren leben. Die Assoziation mit einem Wirt bedingt eine Vielzahl von Veränderungen bezüglich der physikalischen, chemischen und biologischen Bedingungen und stellt eine sehr spezielle Mikroumwelt dar. Bedeutende Parameter sind in diesem Zusammenhang der pH-Wert, die Sauerstoffversorgung und das Nährstoffangebot. Alle marinen Organismen sind von assoziierten Bakterien umgeben. Viele dieser Assoziationen sind von nur sehr kurzer Zeitdauer. In einigen Fällen entwickelt sich jedoch eine hoch spezialisierte Beziehung zwischen Wirt und Symbiont, was in der Evolution eine wichtige Rolle spielt [Jensen & Fenical 1996]. Die aus marinen Bakterien isolierten Substanzen weisen ein breites Strukturspektrum auf, das von zyklischen Peptiden, niedermolekularen Fettsäurederivaten, Heterocyclen, Aminoglykosiden bis hin zu hoch bromierten Pyrrolen reicht. Diese Substanzen

besitzen antimikrobielle, antivirale, zytotoxische oder anti-inflammatorische Aktivitäten [Austin 1989].

Der erste 1966 beschriebene Metabolit aus einem marinen Bakterium ist ein hoch bromiertes Pyrrol-Antibiotikum. Bei dem Produzenten handelt es sich um ein Bakterium der Gattung *Alteromonas*, das von der Oberfläche des karibischen Seegrases *Thalassia* isoliert wurde. Neben der antibakteriellen Wirkung gegen grampositive Bakterien weist Pentabromopseudilin auch Antitumorwirkung auf [Fenical 1993]. Ein weiteres bromiertes Antibiotikum wurde 1976 von einer französischen Arbeitsgruppe aus der Kultur von *Alteromonas luteoviolaceus* isoliert. Dieser Stamm produziert neben zwei intrazellulären bromierten Antibiotika auch noch zellgebundene polyanionische Polysaccharide mit antimikrobieller Wirkung, die an das Medium abgegeben werden [Gauthier & Flatau 1976, Gauthier 1976b]. Aus verschiedenen marinen Mikroorganismen wurden weitere interessante Wirkstoffe isoliert, z.B. die anti-inflammatorischen Salinamide von marinen Streptomyceten [Trischman *et al.* 1994]. Ein wichtiger Vertreter der marinen schwammassoziierten Bakterien ist *Vibrio* sp. aus *Dysidea* sp. des indischen Ozeans. In Kultivierungen produziert der Mikroorganismus geringe Mengen bis-Dibromo-phenylether [Kobayashi & Ishibashi 1993].

Im Vergleich zu Schwämmen als Naturstoffquelle sind die marinen Mikroorganismen ohne Raubbau an den natürlichen Ressourcen des Meeres zu gewinnen, in Reinkultur zu überführen, in Bioreaktoren massenhaft kultivierbar und auch gentechnologischen Verfahren zum Zwecke der Optimierung der Produktion zugänglich. Ein großes Problem stellt jedoch die Isolierung der Species dar, da weniger als 5 % aller marinen Bakterien unter Standardbedingungen wachsen [Ferguson *et al.* 1984]. Die unterschiedlichen Ansprüche an Salzgehalt, Nährstoffe u.ä. die aufgrund der Diversität der ökologischen Nischen im Meer entstehen, reduzieren die Anzahl der Species bei der Gewinnung erheblich, da jedes Verfahren eine gewisse Selektivität aufweist [Jensen & Fenical 1994, Austin 1988]. Die systematische Erfassung der kultivierbaren Mikroorganismen mariner Habitate und ihre phylogenetische Einordnung ist die Voraussetzung für die Nutzung dieser mikrobiellen Diversität hinsichtlich der Naturstoffproduktion. Als langfristige Strategie ist die Entwicklung von Sonden für bisher unkultivierbare phylogenetische Gruppen und ihr Einsatz in neuen Kultivierungstechniken notwendig, die ganz neue Organismengruppen erschließen werden [deLong 1997, Wagner-Döbler 1998].

In den letzten Jahren geht der Trend immer mehr dahin, neue extreme Habitate zu erschließen, die Mikroorganismen zu isolieren und nach neuen Naturstoffen zu screenen [Russel 1998].

Neben den Bakterien stellen auch marine Pilze und Algen (Cyanobakterien) ein großes Potential für neue marine Naturstoffe dar. Die bekanntesten Metabolite von Mikroalgen sind die Toxine Saxitoxin, Okadainsäure und Bevetoxin, die aus Dinoflagellaten isoliert wurden. Die Aufmerksamkeit auf marine Pilze als Sekundärmetabolitproduzenten wurde durch die Entdeckung verschiedener Antibiotika gelenkt. Ein Beispiel ist das bereits von terrestrischen Pilzen bekannte Cephalosporin aus *Cephalosporium* sp., das heute bereits therapeutische Anwendung findet [König & Wright 1998a] und die umsatzstärkste Substanzklasse am Antibiotika-Weltmarkt darstellt.

Ein sehr bedeutendes Kriterium bei der Suche nach neuen Wirkstoffen ist die Wahl und Vielfalt der biologischen Aktivitätstests. Im Allgemeinen wird eine Kombination aus verschiedenen Bioassays verwendet. Ein guter Assay sollte folgende Bedingungen erfüllen:

- a) hohe Empfindlichkeit, Detektion der bioaktiven Substanz im Rohextrakt
- b) hohe Kapazität
- c) schnelle Ergebnisse
- d) kostengünstig

Eine Klassifikation möglicher Aktivitätstests in drei Gruppen zeigt die Varianz der Bioassays. Zum einen können chemotherapeutische Tests verwendet werden, die Wirkstoffe gegen Infektionen und Krebs detektieren. Eine weitere Möglichkeit bieten die klassischen pharmakologischen Experimente mit lebenden Tieren, aus denen Organe und Zellen isoliert und für spezifische Bindungsassays verwendet werden. Eine dritte Gruppe der Testsysteme stellen die biochemischen Assays dar, in denen bestimmte Enzymreaktionen zur Detektion verwendet werden [Claeson & Bohlin 1997, Doser & Planck 1999].

Da Naturstoffe häufig sehr komplexe chemische Strukturen aufweisen und ihre Synthese sehr schwierig und zeitaufwendig ist, hat sich in den letzten Jahren verstärkt das Hochdurchsatzmuster (High-throughput screening, HTS) von Substanzdatenbanken durchgesetzt. Mit modernen HTS-Automaten können Hunderttausende von Verbindungen innerhalb weniger Tage auf spezifische Aktivitäten untersucht werden. In diesen Tests werden antagonistische oder agonistische Effekte auf einen speziellen biologischen Wirkort, z.B. Zelloberflächenrezeptoren oder metabolische Enzyme, detektiert [González & Negulescu 1998, Kell 1999]. Aufgrund der aufwendigen zeitintensiven Isolierung von Naturstoffen gibt

es bisher kaum Substanzdatenbanken mit Reinsubstanzen. Der Aufbau einer zentralen Sammlung von Naturstoffen am Hans-Knöll-Institut in Jena, dem „Naturstoffpool“, ist ein erster Schritt in diese Richtung. Da die zeitaufwendige Isolierung von Naturstoffen mit dem HTS nicht kompatibel ist, gehen derzeit Bestrebungen der Firma Merck, Darmstadt und AnalytiCon AG, Berlin dahin, mittels innovativer Fraktionierungstechnologien innerhalb kürzester Zeit hochkomplexe Substanzgemische vollautomatisch in reine oder nahezu reine Substanzen aufzutrennen und anschließend direkt in biologischen Testsystemen einzusetzen [Mellor *et al.* 1997]. Eine weitere Methode, bei der die Probenaufarbeitung auf Basis der Festphasenextraktion erfolgt, wurde kürzlich von einer Arbeitsgruppe aus Jena in Zusammenarbeit mit der Firma Zymark vorgestellt [Schmidt *et al.* 1999]. Es wurde somit ein weiterer Schritt in die Richtung aufgezeigt, die das Naturstoffscreening attraktiver und erfolgreicher macht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Screening nach bioaktiven Naturstoffen aus schwammassoziierten marinen Mikroorganismen der kroatischen Adriaküste durchgeführt werden. Die erste Aufgabe bestand in der Isolierung der Mikroorganismen unter Anwendung ausgewählter Screeningparameter. Die Etablierung von biologischen Aktivitätstests (antibakterielle, fungizide, algizide und toxische Aktivitäten) war ein wesentlicher Schritt in dieser Arbeit. Für die Durchführung verschiedener Tests war die Entwicklung eines geeigneten Aufbereitungsverfahrens der Bakterienkulturen erforderlich, gefolgt von chromatographischen Aufreinigungsverfahren, die eine Strukturaufklärung der Naturstoffe ermöglichen sollten. Neben der Naturstoffcharakterisierung war die taxonomische Einordnung der Bakterien mittels mikrobiologischer Techniken erforderlich. Im zweiten Schritt dieser Arbeit sollte das Wachstumsverhalten eines ausgewählten marinen Bakteriums charakterisiert und die Biomasse- und Wirkstoffproduktion durch Optimierung verschiedener Wachstumsparameter verbessert und im Rahmen eines Scale up auf eine Bioreaktorkultivierung angewendet werden.

II. Material und Methoden

1. Chemikalien

Neben den anschließend aufgeführten Chemikalien wurden analysenreine Substanzen folgender Firmen verwendet:

Merck, Darmstadt
Sigma Chemical Company, USA
Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm
Riedel de Haën, Seelze

1.1 Chemikalien für Nährmedien

Marine Broth	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Bacto Pepton	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Hefeextrakt	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Bacto Agar	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Standard-Nährmedium	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Malzextrakt	Difco-Laboratories, Detroit/USA
Technischer Hefeextrakt	Ohly Chemie, Hamburg
Cerelose (Glukose * H ₂ O)	Cerestar, Krefeld

2. Mikroorganismen für spezielle Tests

<i>Vibrio fischeri</i>	DSM 7151
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	ATCC 15057
<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	DSM 6842
<i>Bacillus megaterium</i>	Hausstamm, Inst. f. Mikrobiologie TU BS
<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 347
<i>Escherichia coli</i>	DSM 1103
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 346
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSM 1117
<i>Usilago violacea</i>	DSM 1434
<i>Ustilago maydis</i>	ATCC 14826
<i>Eurotium repens</i>	Hausstamm, Inst. f. Mikrobiologie TU BS
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Hausstamm, Inst. f. Mikrobiologie TU BS
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hausstamm, Inst. f. Mikrobiologie TU BS
<i>Mycotypha microspora</i>	CBS 186.68
<i>Chlorella fusca</i>	Stammsammlung f. Algenkultur Göttingen

3. Nährmedien

Alle Nährmedien werden 20 min bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Bei Verwendung von Glukose wird diese in dest. H₂O gelöst, separat sterilisiert und anschließend aseptisch dem Medium hinzugefügt. Zur Herstellung von Agarplatten wird dem Medium jeweils 18 g l⁻¹ Bacto Agar hinzugefügt.

3.1 Marine Broth (MB)

5,0	g l ⁻¹	Bacto Pepton
1,0	g l ⁻¹	Bacto Hefeextrakt
0,1	g l ⁻¹	Eisencitrat
19,45	g l ⁻¹	NaCl
5,9	g l ⁻¹	MgCl
3,24	g l ⁻¹	Na ₂ SO ₄
1,8	g l ⁻¹	CaCl ₂
0,55	g l ⁻¹	KCl
0,16	g l ⁻¹	Na ₂ CO ₃
0,08	g l ⁻¹	KBr
0,034	g l ⁻¹	SrCl ₂
0,022	g l ⁻¹	H ₃ BO ₃
0,0004	g l ⁻¹	Na ₂ SiO ₃
0,0024	g l ⁻¹	NaF
0,0016	g l ⁻¹	NH ₄ NO ₃
0,008	g l ⁻¹	Na ₂ HPO ₄

3.2 Nutrient Broth (NB)

3,5	g l ⁻¹	Standard-Nährmedium
-----	-------------------	---------------------

3.3 Malz-Pepton-Hefeextrakt (MPY)

20,0	g l ⁻¹	Malzextrakt
2,5	g l ⁻¹	Bacto Pepton
2,5	g l ⁻¹	Hefeextrakt

3.4 Algen-Medium (CP)

10	g l ⁻¹	Hefeextrakt
10	g l ⁻¹	Glukose * H ₂ O

pH-Korrektur auf 6,2

3.5 *Vibrio fischeri*-Medium (VF)

30,0	g l ⁻¹	NaCl
6,1	g l ⁻¹	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O
2,75	g l ⁻¹	K ₂ HPO ₄ * 3 H ₂ O
0,204	g l ⁻¹	MgSO ₄ * 7 H ₂ O
0,5	g l ⁻¹	(NH ₄) ₂ HPO ₄
3,0	ml l ⁻¹	Glycerin (99 %)
5,0	g l ⁻¹	Bacto Pepton
0,5	g l ⁻¹	Hefeextrakt

pH-Korrektur auf 7,5

4. Gewinnung von Bakterien aus Schwämmen

Die verwendeten Schwammproben wurden im August 1996 und 1997 verschiedenen Standorten der Adriaküste vor Rovinj (Kroatien) entnommen. Die Proben entstammen sowohl dem offenen Meer (Banjole) als auch dem dort mündenden Kanal (Lim) aus einer Tiefe zwischen 2 und 30 m.

Die frischen Schwammproben werden nach der Ernte unter sterilen Bedingungen sofort weiter behandelt. Mit Hilfe von Mörser, Pistil und Pipette wird der Schwamm ausgepreßt und die erhaltene Flüssigkeit auf vorbereitete MB-Agarplatten mittels Drigalskispatel ausplattiert. In einem weiteren Ansatz werden 500 µl der ausgepreßten Flüssigkeit in 100 ml Flüssigmedium gegeben und bei 100 Upm inkubiert. Als Parameter werden Temperatur und Medium variiert. Von der Flüssigkultur werden täglich 500 µl auf eine Agarplatte überimpft und ausplattiert. Die gewachsenen Bakterien werden täglich von der Agarplatte gepickt und auf eine neue überimpft. Die Aufreinigung der einzelnen Bakterienisolate erfolgt durch Reinigungsausstriche oder durch Verdünnungsausstriche über fünf Platten.

5. Stammhaltung und Konservierung

5.1 Stammkulturen

Zur Stammhaltung der isolierten Mikroorganismen werden Schrägagarröhrchen verwendet, die jeweils mit 7 ml Marine Broth-Agar gefüllt sind. Nach dem Beimpfen mit der Reinkultur wird das Röhrchen bei 27°C inkubiert, bis der Organismus gewachsen ist. Anschließend wird das Schrägagarröhrchen luftdicht verschlossen und kann bei 4°C für ca. 4 Wochen aufbewahrt werden.

5.2 Konservierung in Glycerin

Eine frische Schrägagarkultur wird mit 5 ml sterilem Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,2) aufgeschwemmt und 1 ml dieser Suspension in ein steriles, vorgekühltes mit 4 ml Glycerin (60 %) gefülltes Schraubkappenröhrchen überführt, vermischt und bei -20°C eingelagert. Das Röhrchen kann ca. 6 Monate aufbewahrt werden.

5.3 Konservierung in flüssigem Stickstoff

Lagermedium:

10 g l⁻¹ Magermilchpulver

100 ml Glycerin (80 %)

mit dest. H₂O auffüllen und bei 115°C, 15 min autoklavieren

Frische Schrägagarröhrchen werden mit 5 ml des Lagermediums aufgeschlemmt. Die Suspension wird portioniert und in Plastikampullen überführt. Anschließend werden diese bei -80°C 2 h vorgefroren und können dann in flüssigem Stickstoff eingelagert werden.

6. Charakterisierungsmethoden für Bakterien

6.1 Morphologische Charakterisierungsmethoden

6.1.1 Mikroskopie

Für die Differenzierung von Bakterien ist die Kenntnis der mikroskopischen und makroskopischen Formen wichtig. Es wird zwischen drei Hauptwachstumsformen unterschieden:

- a) kugelförmig (Monokokken, Diplokokken, Tetrakokken, Sarzinen, Streptokokken, Staphylokokken)
- b) stäbchenförmig (Kurzstäbchen, Normalstäbchen, Langstäbchen, Kettenstäbchen)
- c) schraubenförmig (Spirillen, Vibrionen, Spirochäten)

Beobachtungen zu Bakterienformen, Bildung von Sporen und der Beweglichkeit von Zellen werden mit einem Mikroskop (Zeiss Axioskop, Jürgensen) bei 100facher Vergrößerung gemacht.

Die makroskopischen Formen der Bakterien, die typisch für die einzelnen Gattungen bzw. Arten sind, liefern weitere Anhaltspunkte bei der Differenzierung. Auf festen Nährböden treten verschiedene Kolonien punktförmig, kreisförmig, baumartig verzweigt (wurzelförmig) oder gelocht auf, mit unregelmäßigen, unterschiedlichen Höhenentwicklungen und Randausbildungen.

6.1.2 KOH-Test (Test auf Lipopolysaccharide)

Auf einen Objektträger wird ein Tropfen 3 %ige KOH-Lösung und eine Impföse Bakterienkultur aufgebracht. Mit der Impföse wird wenig KOH-Lösung in die Bakterienmasse überführt und verrieben. Mit KOH werden Lipopolysaccharide aus der Bakterienzellwand gelöst. Beim vorsichtigen Hochziehen der Nadel sind bei gramnegativen Bakterien aufgrund der zähen klebrigen Konsistenz der Lipopolysaccharide Fäden erkennbar. Sind keine Fäden erkennbar, handelt es sich um grampositive Keime.

6.1.3 Elektronenmikroskopie

Elektronenmikroskopische Bilder entstehen durch Wechselwirkungen eines durch Anlegen einer Hochspannung (20-100 kV) im Hochvakuum beschleunigten Elektronenstrahles mit den Atomen des Untersuchungsobjektes. Mikrobiologische Objekte enthalten überwiegend Elemente niedriger Ordnungszahl und liefern daher kontrastarme Bilder. Die erforderliche Kontrastierung erfolgt entweder durch Zugabe von Kontrastierungsmittel (z.B. Uranylacetat, Bleiacetat) oder durch Schrägbedampfung mit Kohle oder Metallen (Pt/Pd, Au). Bei Suspensionspräparaten wird die Negativkontrastierung (negative staining) angewendet¹ [Freese *et al.* 1997; Yakimov *et al.* 1998].

6.2 Physiologische Charakterisierungsmethoden

6.2.1 Oxidasetest

Der Oxidasetest wird zur Unterscheidung von oxidativ-fermentativen, gramnegativen Bakterien von Enterobakterien durchgeführt. Das Enzym Cytochromoxidase wird durch die Oxidation von Dimethylparaphenylendiamin und Naphthol unter Bildung von Indophenolblau nachgewiesen. Das frische Bakterienisolat wird auf einen Teststreifen (Bactident[®] Oxidase, Merck) verrieben. Oxidase – positive Bakterien färben sich innerhalb von 30 – 60 Sekunden blau. Später eintretende Blaufärbung gilt als negativ.

6.2.2 BBL[®] Oxi/Ferm[™] Tube II

Zur Identifizierung von Bakterien aus der Gruppe der oxidativ-fermentativen, gramnegativen Stäbchen wird das Testsystem BBL[®] Oxi/Ferm[™] Tube II (Becton Dickinson) verwendet. Die in 12 Kammern des Teströhrchens befindlichen Spezialmedien ermöglichen den gleichzeitigen Nachweis von 14 verschiedenen biochemischen Eigenschaften, die von verschiedenen Indikatorsystemen angezeigt werden. Nach 48stündiger Bebrütung wird der Test durch Vergleich mit einem Standardbild ausgewertet. Bei Addition der positiven

¹ Ich danke Herrn Dr. H. Lünsdorf, Institut für Mikrobiologie, GBF Braunschweig, für die Durchführung der Elektronenmikroskopie.

Reaktionen ergibt sich eine fünfstellige Schlüsselzahl (ID value), die zur Bestimmung des Keimes durch Nachschlagen im CCIS (Computer Coding and Identification System) verwendet wird.

6.2.3 BBL[®] Enterotube II

Zur Identifizierung von aeroben, fakultativ anaeroben, gramnegativen, Oxidase-negativen Stäbchen, (Enterobacteriaceae) wird das Testsystem BBL[®] Enterotube[™] II (Becton Dickinson) verwendet. Die in den Kammern des Teströhrchens befindlichen Spezialmedien ermöglichen den gleichzeitigen Nachweis von 15 verschiedenen biochemischen Eigenschaften der Bakterien. Alle Kammern werden in einem Arbeitsgang gleichzeitig beimpft und nach 24stündiger Bebrütung wie unter 6.2.2 beschrieben ausgewertet.

6.2.4 BBL Crystal[™]

Zur Identifizierung von grampositiven Bakterien wird das Mikrotestsystem BBL[®] Crystal[™] (Becton Dickinson) verwendet, das modifizierte fluorogene und chromogene Substrate enthält. Ein frisches Bakterienisolat wird in Inokulumsflüssigkeit suspendiert und in die Reaktionskammer überführt. Das Reaktionsgefäß wird bei 27°C für 18 bis 24 h inkubiert. Anschließend werden die einzelnen Reaktionen auf Farbumschläge und Fluoreszenz untersucht. Das sich ergebende Muster der 29 Reaktionen wird in eine zehnziffrige Profilnummer umgewandelt, die der Identifizierung dient.

6.3 Phylogenetische Charakterisierungsmethoden

6.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine *in vitro* Amplifikation einer spezifischen DNA-Region, in dem die Abläufe der zellulären *in vivo* DNA-Replikation nachgeahmt werden.

Bei phylogenetischen Studien zur Ermittlung von Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Prokaryoten werden Sequenzvergleiche der ribosomalen RNA durchgeführt. Das 16S rRNA

Gen wird amplifiziert und anschließend nach der Sanger-Methode sequenziert. Das Molekül besitzt 1.500 Nukleotide, wobei einige Regionen sehr hohe Homologien aufweisen und andere Sequenzabschnitte wiederum hohe Variabilitäten besitzen. Diese Bereiche sind für Sequenzvergleiche interessant und werden zur Ermittlung von Verwandtschaftsbeziehungen herangezogen^{2,3}. In Datenbanken für RNA-Sequenzen (z.B. FASTA), die über das Internet zugänglich sind, befinden sich über 10.000 Sequenzen, aus denen dann die besten Korrelationen ermittelt werden (Neighbor-Joining Methode). Die häufigste Methode zur Erstellung eines phylogenetischen Baumes aus rRNA-Sequenzen ist die *distance-matrix method*. Es werden zwei rRNA Sequenzen *aligned* und mit Hilfe eines Computers wird die evolutionäre Entfernung (E_D) anhand der Anzahl der unterschiedlichen Positionen in der Sequenz ermittelt. Anschließend wird ein statistischer Korrekturfaktor ermittelt, der die Anzahl der Multiplikationen beschreibt, die für den Übergang in die gleiche Sequenz erforderlich ist (Bootstrap-Wert). Aus der Matrix der evolutionären Entfernungen wird anschließend der Dendrogramm-Baum erstellt [Madigan *et al.* 1997].

Für den in dieser Arbeit erstellten phylogenetischen Baum wurden folgende Sequenzen verwendet:

<i>Pseudoalteromonas bacteriolytica</i>	Acc.No. D89929
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	X82134
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	X82138
<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	X82137
<i>Pseudoalteromonas aurantia</i>	X82135
„ <i>Pseudoalteromonas</i> Y“	AF030381
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	X82141
„ <i>Pseudoalteromonas peptidysin</i> “	AF007286
<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	X82147
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	X82144
<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	U85855
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> ssp. <i>teradonis</i>	X82139
<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> ssp. <i>haloplanktis</i>	X67024
„ <i>Pseudoalteromonas gracilis</i> “	AF03844
„ <i>Pseudoalteromonas antartica</i> “	X98336
<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	X82146
<i>Pseudoalteromonas undina</i>	X82140
<i>Pseudoalteromonas carageenovora</i>	X82136
<i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	X82143

² Ich danke Herrn I. Prokic, Institut für Physiologische Chemie, Uni Mainz, für die Teilsequenzierung (800 Nukleotide) der 16 S rRNA.

³ Ich danke Herrn Dr. R. Pukall, DSMZ Braunschweig, für die Sequenzierung des zweiten Teils der 16 S rRNA und die Erstellung des Stammbaumes.

7. Tests biologischer Aktivitäten

7.1 Antimikrobielle Aktivitätstests

Testorganismen:

- a) grampositive Bakterien (*Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*)
NB-Agar, 30°C, Dunkelheit, 24 h
- b) gramnegative Bakterien (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*)
NB-Agar, 30°C, Dunkelheit, 24 h
- c) Pilze (*Ustilago violacea*, *Ustilago maydis*, *Fusarium oxysporum*, *Eurotium repens*, *Mycotypha microspora*, *Cladosporium cucumerinum*)
MPY-Agar, 27°C, Dunkelheit, 3-5 Tage
- d) Alge (*Chlorella fusca*)
CP-Agar, 20°C, 16 h hell, 8 h dunkel, 5 Tage

7.1.1 Overlaytest

Zur Erfassung des Wirkspektrums der verschiedenen Bakterienisolate wird ein Overlaytest durchgeführt. Auf entsprechende Agarplatten werden die marinen Bakterienisolate punkt- oder strichförmig bis zu einer hohen Zelldichte herangezogen. Anschließend wird die Agarplatte mit einer frischen Testorganismensuspension (0,9 %iger NaCl-Lösung) unter aseptischen Bedingungen in einer Sprühkammer angesprüht und entsprechend der Wachstumsbedingungen des Testorganismus inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wird der Hemmhofdurchmesser ermittelt.

Problem: Bei unterschiedlichen Anforderungen von Bakterienisolat und Testorganismus an das Medium ist der Overlaytest ungeeignet!

7.1.2 Plättchentest

Zur Erfassung des Wirkspektrums des Kulturextraktes wird ein Plättchentest durchgeführt. Auf entsprechende Agarplatten wird jeweils ein steriles Testplättchen (Cellulosefilter, 6 mm Ø) aufgelegt und sofort jeweils 10-15 µl Extrakt darauf pipettiert. Nach 2 h wird die

Agarplatte wie in 7.1.1 behandelt und inkubiert. Anschließend wird der Hemmhofdurchmesser ermittelt. Die Größe des Hemmhofes ist von der Diffusion der Substanz, der Diffusionszeit, der Temperatur, der Impfdichte und dem physiologischen Zustand des Testorganismus abhängig (Abb. II.1).

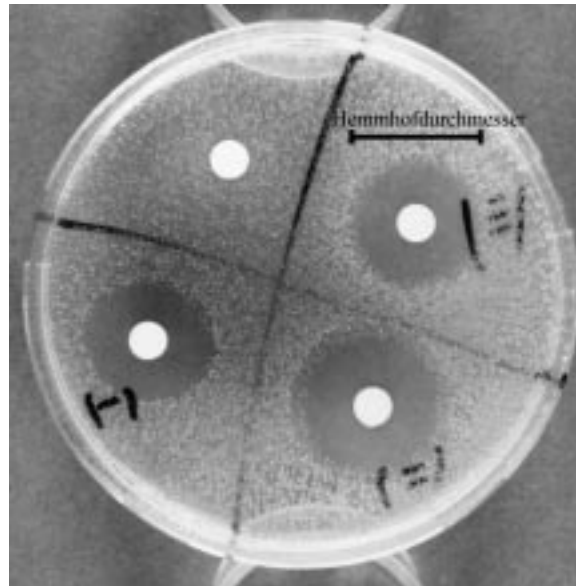


Abb. II.1: Agarplatte mit positiven Extrakten im Plättchentest.

Inhibierung des Wachstums von *B. megaterium* durch Kulturextrakte im Plättchentest. NB-Agar, 30°C, 24 h Inkubation.

7.1.3 Dünnschichtchromatographie-Overlaytest (DC-Overlaytest)

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Kap. 13.1) werden zwei Chromatogramme des Extraktes angefertigt. Zur Lokalisation der bakteriziden Substanzen wird ein Chromatogramm auf eine NB-Agarplatte gelegt, nach 1,5 h wieder entfernt und anschließend wie unter 7.1.1 beschrieben behandelt.

Durch Vergleich der inkubierten Agarplatte mit dem zweiten Chromatogramm (Detektion vgl. 13.1), kann eine Zuordnung der wirksamen Substanz erfolgen (Abb. II.2).

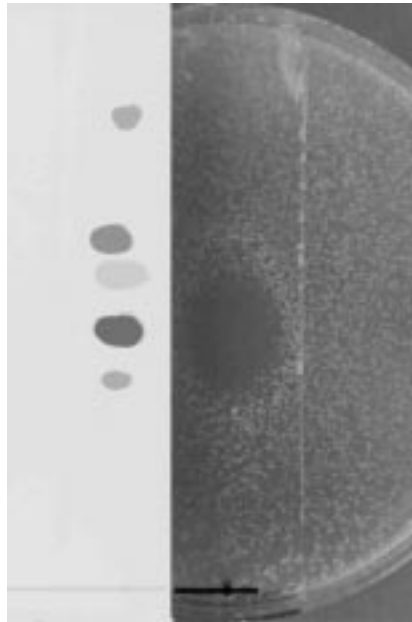


Abb. II.2: Bioautogramm eines Zellextraktes.

Chromatogramm: Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufmittel: CHCl₃/Methanol/H₂O; 65/15/2. Inhibierung des Wachstums von *B. megaterium* durch ein Extrakt im Overlaytest auf NB-Agar, 30°C, 24 h Inkubation.

7.1.4 Röhrchentest

Mit Hilfe des Röhrchentests wird die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die Wirkstoffkonzentration bei 50 %iger Wachstumshemmung (IC₅₀-Wert) ermittelt. Die Methode wird entsprechend des Bouillon-Dilutionstests DIN 58940 Teil 5 durchgeführt [Normenausschuß Medizin 1989]. Von dem Extrakt wird eine 1,024 g l⁻¹ Stammlösung in NB-Medium und DMSO als Lösungsvermittler hergestellt, aus der jeweils 1 ml aller weiteren Verdünnungen hergestellt werden. Die Reagenzglas-Ansätze werden mit 1 ml einer 18 ± 2 h alten Testorganismuskultur mit einer Animpfdichte von 10⁵ – 10⁶ Keimen pro ml gestartet. Die Inkubation erfolgt bei 30°C, 240 Upm (Schüttelmaschine LabShaker, Braun Melsungen) für 18 h. Als Referenz für vollständige Wachstumshemmung wird ein Ansatz mit NB-Medium und Inokulum bei 4°C inkubiert. Die Wirkstoffkonzentration, bei der die Keimzahl des Referenzansatzes erreicht wird, entspricht dem MHK-Wert. Der IC₅₀-Wert ergibt sich aus der Konzentration, bei der die Hälfte der Keimzahl des Ansatzes mit NB-Medium und Inokulum, der bei 30°C inkubiert wird, erreicht ist.

7.1.5 Produktbestimmung mittels Plättchentest

Aufgrund einer Linearität zwischen dem Logarithmus der Wirkstoffmenge im Agar-Reservoir und dem Hemmhofdurchmesser ist eine Konzentrationsbestimmung anhand der antimikrobiellen Wirkung einer Substanz möglich. In Abb. II.3 ist die Kalibrationsgerade zur Konzentrationsbestimmung des Wirkstoffes von MH-Cr 6.3 dargestellt.

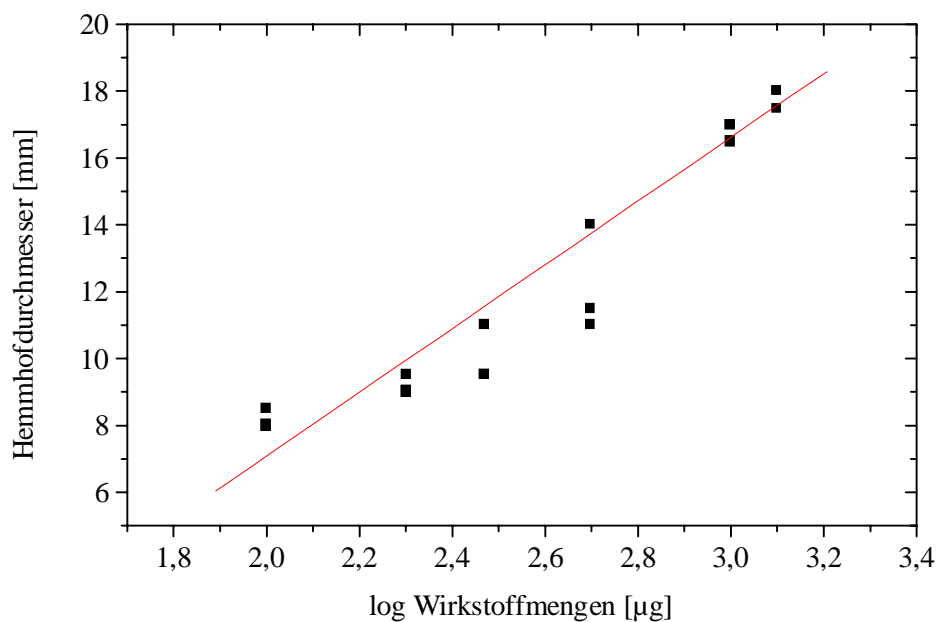


Abb. II.3: Kalibrationsgerade der antimikrobiellen Fettsäurefraktion.

Verschiedene Mengen der antimikrobielle Fettsäurefraktion (39,39 % C16:1^{Δ9} und 5,30 % C17:1^{Δ9}) aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3 wurden im Plättchentest mit *B. megaterium* eingesetzt (NB-Agar, 24 h). Durch lineare Regression wurde die Kalibrationsgerade ermittelt ($R = 0,9858$).

7.2 Biolumineszenztest

Auf Grundlage des Leuchtbakterientests nach DIN 38412 L34 (L341) [Normenausschuß Wasserwesen 1992], mit dem akut toxische Eigenschaften von verschiedenen Proben bestimmt werden können, wurde ein erweitertes Verfahren entwickelt, mit dem einzelne toxische Verbindungen aus Stoffgemischen detektiert werden können [Ziesenis & Grabert 1995; Kern 1997; Eberz *et al.* 1997]. Bei diesem Test wird die Emission von grün/blauem

Licht der Bakterien ausgenutzt, die bei Oxidation von FMNH₂ und langkettigem Aldehyd mit Sauerstoff in Anwesenheit von Luziferase erfolgt. Sie spiegelt *in vivo* den Stoffwechselzustand der Zelle wider. Auf toxische Substanzen, die vitale Energieprozesse beeinflussen, reagiert die Zelle mit Verminderung der Biolumineszenz [Lümmen 1988].

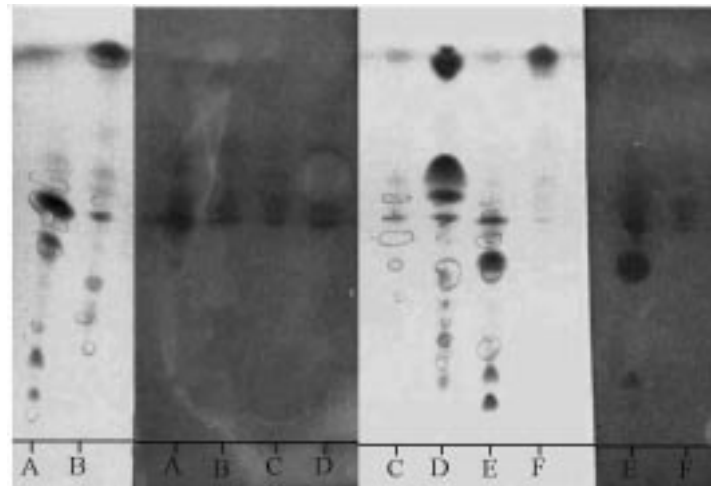


Abb. II.4: Detektion toxischer Substanzen nach DC-Analyse.
Kieselgel F₂₅₄; Laufmittel CHCl₃/Methanol/H₂O (65+15+2); Detektion: helle DC: Anisaldehyd; dunkle DC: *Vibrio fischeri* – Suspension.

Der Stamm *Vibrio fischeri* DSM 7151 wird in VF-Medium, 100 ml Schüttelkolben bei 27°C und 100 Upm für 24 – 36 Stunden kultiviert.

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Kap. II.13.1) werden zwei Chromatogramme des Extraktes angefertigt. Nach der Auftrennung wird die Kieselgelplatte sorgfältig getrocknet und für 3 s in die Kultursuspension von *Vibrio fischeri* getaucht. Nach ca. 10 s kann für eine Dauer von etwa 15 min das Leuchten der DC im Dunkeln beobachtet werden, wobei toxische Substanzen als dunkle Flecke erscheinen. Durch Vergleich mit dem zweiten Chromatogramm können je nach Detektion Rückschlüsse auf Substanzgruppe und Stoffeigenschaft gezogen werden (Abb. II.4). Die quantitative Bestimmung erfolgt nach dem gleichen Verfahren wie unter 7.1.2 beschrieben. Das Ausmessen der Hemmhöfe erfolgt jedoch im Dunkeln mit Hilfe einer Schablone.

7.3 Externe Aktivitätstests

Die erhaltenen Rohextrakte (Zellextrakt und Überstandsextrakt) und alle aufgereinigten Substanzen werden für verschiedene Tests anderen Instituten und Firmen zur Verfügung gestellt. Tab. II.1 zeigt eine Übersicht aller weiteren getesteten biologischen Aktivitäten.

Tab. II.1: Externe Tests zur Ermittlung weiterer biologischer Aktivitäten.

Wirkung	Durchführung	Testprinzip	Testorganismus	Meßbereich
zytotoxisch	Inst. f. Physiologische Chemie, Abtg. Molekularbiologie, Uni Mainz	s. 7.3.1	L 5178 Y-Zellen (Maus-Lymphocyten-Zellen)	10 µg ml ⁻¹
neuroprotektiv	Merz + Co., Frankfurt	[³ H]-MK-801-Bindungassay [Foster & Wong 1987]	Hirnhaut einer männlichen Ratte	300 µg ml ⁻¹
zytotoxisch	Inst. f. Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig	Bestimmung der Todesrate nach 24 und 48 h	<i>Artemia salina</i> (Krebs)	500 µg ml ⁻¹
nematozid	Inst. f. Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig	Bestimmung der Todesrate nach 24 und 48 h	<i>Caenorhabditis elegans</i> (Fadenwurm)	500 µg ml ⁻¹
antitumoral	KTB Tumorforschung GmbH, Freiburg	Bestimmung von Proteinkinase-aktivitäten	7 verschiedene Proteinkinasen s. 7.3.4	10 µg ml ⁻¹
antiviral	Fraunhofer Institut, Hannover	Resistenz humaner Fibrioblasten gegen EMCV	Encephalomyocarditis-Virus (EMCV)	

7.3.1 Zytotoxische Aktivitäten

Die toxische Wirkung isolierter Extrakte und reiner Substanzen wird mit Hilfe von L 5178 Y-Zellen getestet. Lebende Zellen sind in der Lage 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid aufzunehmen und mit Hilfe von Dehydrogenasen zu einem stark blauen wasserlöslichen Farbstoff umzusetzen. Die Konzentration des Farbstoffes steht in direktem Zusammenhang mit der Zellzahl und der metabolischen Aktivität der Zellen. Durch Zusatz verschiedener Konzentrationen einer toxischen Substanz als DMSO-Lösung wird der LD₅₀ bestimmt.

7.3.2 Neuroprotektive Aktivitäten

Der bedeutendste und häufigste ionotrophe Rezeptor ist der N-Methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptor. Der NMDA-Rezeptor ist mit einem Kationenkanal verbunden, der eine hohe Leitfähigkeit für Calciumionen besitzt. Er weist eine Reihe von Bindungsstellen für Agonisten und Antagonisten auf. Hohe Konzentrationen von NMDA-Rezeptor-Agonisten (z.B. Glutamat, Aspartat, NMDA) bewirken eine Überaktivierung des Rezeptors, was zu einem starken Einstrom von Calciumionen in die Neuronen führt. Hierdurch werden eine Reihe von Calcium-abhängigen Enzymen aktiviert, was schließlich zum Absterben der Zellen führt.

Bei der Suche nach NMDA-Rezeptor-Antagonisten mit dem [³H]-MK-801-Bindungsassay werden Glycin, Glutamat und Protein als Referenzen mitgeführt.

7.3.3 Nematozide Aktivitäten

Nematozide wirken vor allem als Atemgifte und sind als chemische Bodendesinfektionsmittel zur Bekämpfung von phytopathogenen Nematoden von Interesse. Der biologische Aktivitätstest erfaßt chemische Substanzen, die aufgrund ihrer spezifischen Wirkung die Nematoden (Fadenwürmer) *Caenorhabditis elegans* abtöten.

7.3.4 Hemmung und Aktivierung von Proteinkinasen

Proteinkinasen sind wichtige regulatorische Komponenten bei der Initiierung und Progression von Tumoren. Daher gelten Proteinkinasen als wichtige Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente gegen Krebs. Gesucht werden vor allem Kinase-Inhibitoren, die mit hoher Selektivität eine spezifische Kinase ≥ 50 % hemmen, die z.B. überexprimiert ist oder eine zu hohe Aktivität besitzt. In Tab. II.2 sind alle getesteten Enzyme aufgeführt.

Tab. II.2: Übersicht der getesteten Proteinkinasen bei der Ermittlung der antitumoralen Wirkung.

Proteinkinasen	
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
PDGF-Rb-TK	Tyrosinkinase des b-Rezeptors des <i>Platelet-derived Growth Factor</i>
EGF-R-TK	Tyrosinkinase des Rezeptors für <i>Epidermal Growth</i>
ErbB2-TK	Tyrosinkinase des ErbB2-Rezeptors
FGF-R1-TK	Tyrosinkinase des Rezeptor-1 des <i>Fibroblast Growth Factor</i>
IGF-1-R-TK	Tyrosinkinase des <i>Insulin-like Growth Factor Rezeptor</i>
Ins-R-TK	Tyrosinkinase des Insulin-Rezeptors
PKC-g	Proteinkinase C, Subtyp g
PKC-e	Proteinkinase C, Subtyp e
JAK2	Janus-Kinase 2

8. Kultivierungen im Schüttelkolben

Die Untersuchungen zur Mediumszusammensetzung, Wachstumsoptimierung sowie zur Bildung von biologisch aktiven Substanzen werden als Submerskultivierungen in Erlenmeyerkolben mit Schikanen durchgeführt. Je nach Versuchsbedingungen werden Größe des Erlenmeyerkolbens und Inkubationstemperatur variiert. Die Inkubation erfolgt bei 100 Upm auf einer Rotationsschüttelmaschine (Braun Biotech, Melsungen).

8.1 Vorkultur

Mit einer Impföse wird Zellmaterial von einer Schrägagarkultur auf 100 ml steriles MB-Medium in 500 ml Schüttelkolben überimpft. Die Inkubation erfolgt bei 27°C und 100 Upm im Dunkeln. Die Inkubationsdauer variiert bei verschiedenen Bakterienstämmen.

8.2 Hauptkultur

Für die Hauptkultivierungen werden Schüttelkolben von 500 ml, 1 l und 2 l mit 100 ml, 200 ml bzw. 500 ml Medium verwendet. Als Inokulum wird 2 % der Vorkultur hinzugefügt.

Die Inkubation erfolgt bei 100 Upm im Dunkeln. Alle weiteren Parameter werden den jeweiligen Versuchsbedingungen angepaßt.

9. Kultivierungen im Bioreaktor

9.1 Vorkultur

Die Vorkulturen für die Bioreaktorkultivierungen werden wie in 8.1 beschrieben hergestellt. Als Inokulum wird 10 % des Reaktorendvolumens eingesetzt.

9.2 10 l und 50 l Bioreaktor

Es werden Versuche in einem 10 l Bioreaktor (Biostat E, B. Braun, Biotech International, Melsungen) und einem 50 l Bioreaktor (Biostat U50D, B. Braun, Biotech International, Melsungen) durchgeführt. Als Rührsysteme werden Scheibenrührer mit 4 Strombrechern (Rushton-Turbine) verwendet. Das Verhältnis von Rührerdurchmesser und Reaktorumfang beträgt für beide Reaktoren 0,4, so daß bei Berücksichtigung der Reaktorgröße vergleichbare Bedingungen herrschen. Sowohl die Konzentration des gelösten O₂ im Medium, die mit einer Clark-Sauerstoffelektrode (Ingold) amperometrisch bestimmt wird, als auch der pH-Wert (pH-Elektrode InFit 764-50, Ingold) werden online gemessen. In Abb. II.5 ist ein typischer Versuchsaufbau einer durchgeführten Bioreaktorkultivierung dargestellt. Bei den einzelnen Versuchen werden folgende Parameter konstant gehalten:

a) 10 l Bioreaktor

Rührsystem	Rushton-Turbinen
Drehzahl	880 Upm
Temperatur	27°C
pH	7,6 ± 0,2 (Regulation mit 10 % NaOH und 10 % H ₃ PO ₄)
Schaumunterdrückung	steriles Brenntag Ucolub N 115, Polyalkylenglycol (Brenntag Mineralöl GmbH, Mühlheim)
Probenahmesystem	automatisches Probenahmesystem mit Kühlung auf 2°C

b) 50 l Bioreaktor

Rührsystem	Rushton-Turbinen
Drehzahl	520 Upm
Temperatur	27°C
pH	7,6 ± 0,2 (Regulation mit 10 % NaOH und 10 % H ₃ PO ₄)
Schaumunterdrückung	steriles Brenntag Ucolub N 115, Polyalkylenglycol (Brenntag Mineralöl GmbH, Mühlheim)
Flüssigkeitsvolumen	30 l

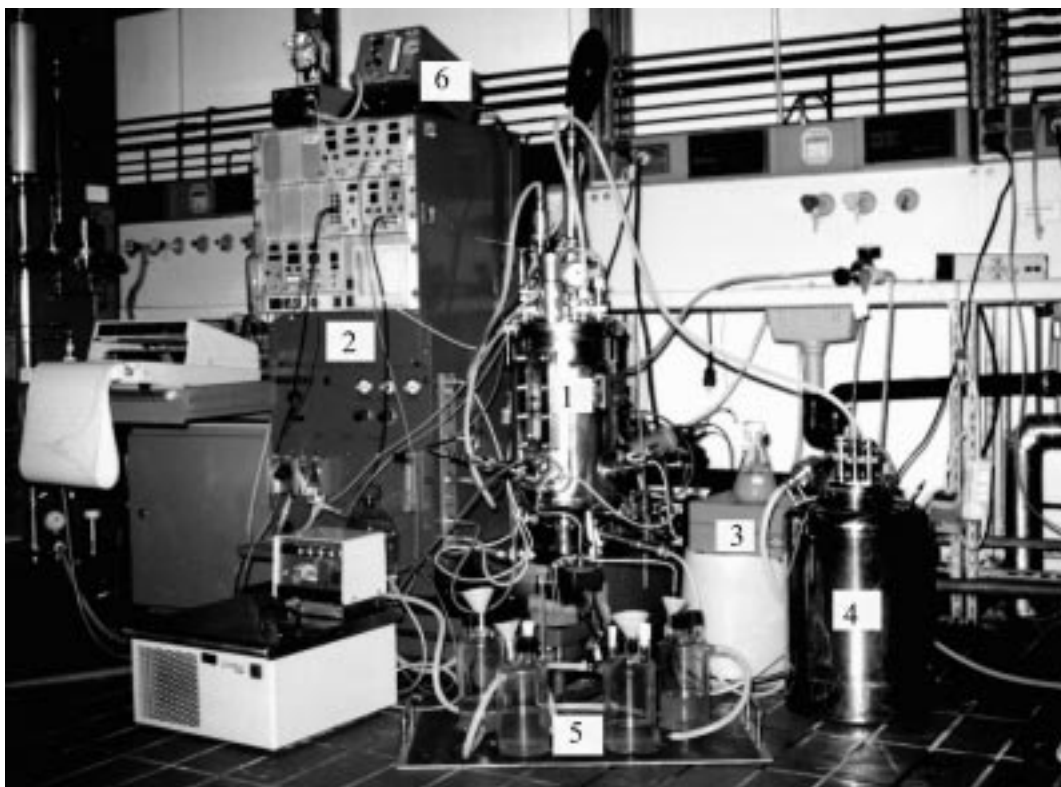


Abb. II.5: 10 l Bioreaktor mit automatischer Probenahme.

1. 10 l Bioreaktor
2. Steuer- und Regeleinheit
3. Pumpe zur automatischen Probenahme mit Zeitschaltuhr
4. Vorratsgefäß mit Medium
5. Probenahmegefäße mit Kühlbad
6. Pumpe zur manuellen Zudosage für Ucolub

10. Kultivierungsparameter

10.1 Zelldichte

Die Zelldichten der Kulturen werden durch Trübungsmessungen in einem Spektralphotometer (Pharmacia LKB, Ultrospec II) bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen dest. H₂O als Blindprobe bestimmt. Die Messungen erfolgen in Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Bei hohen Zelldichten wird die Kulturbrühe mit dest. H₂O soweit verdünnt, daß die gemessene Extinktion zwischen 0,2 und 0,5 liegt.

10.2 Biotrockenmasse

Die Ermittlung der Biotrockenmasse (BTM) ist eine direkte Methode zur Bestimmung der Zellmasse. Vorgewogene Metallbecher werden jeweils mit 10 ml Kulturbrühe gefüllt und 20 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert (Sigma, 3MK). Nachdem der Überstand dekantiert ist, werden die Pellets mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation werden sie bis zur Gewichtskonstanz (24 Stunden) bei 105°C getrocknet und anschließend zurückgewogen.

10.3 Abgasanalyse

Die Reaktorabluft wird direkt einem Gerät zur Abgasanalyse der Firma Maihak (Hamburg) zugeführt. CO₂ wird anhand seiner Absorption im Infrarot-Bereich (Unor 6N) und O₂ anhand seiner paramagnetischen Eigenschaften (Oxigor 6N) quantifiziert. Die Messung des CO₂- und O₂-Gehaltes in der Abluft bei Bioreaktorkultivierungen ermöglicht mit Hilfe der quasi-stationären Inertgasbilanz die Berechnung der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidbildungsrate. Da in einem Batch-Prozeß keine stationären Zustände existieren, werden differentiell kleine Zeitintervalle herausgegriffen und als quasi-stationär betrachtet. Diese Annäherung ist möglich, da die Zeit für eine Abgasmessung sehr kurz gegenüber der gleichzeitigen Biomasseänderung ist.

Folgende Bedingungen müssen für die Bilanz erfüllt sein:

- a) Die Zuluft besteht nur aus Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid
- b) Das Gasgemisch zeigt ideales Gasverhalten
- c) Das Gasgemisch ist trocken und liegt im Normalzustand vor ($p = 1$ bar, $T = 273$ K)
- d) Der Volumenstrom V' ist konstant und bekannt

Aus den durch die Abgasanalyse zugänglichen Stoffmengenanteilen von Sauerstoff und Kohlendioxid ergeben sich über folgende Zusammenhänge die Sauerstoffaufnahmerate QO_2 und die Kohlendioxidbildungsrate QCO_2 :

$$QO_2 [gl^{-1}h^{-1}] = \frac{V' p^N x_{O_2} M_{O_2}}{V_F RT^N} \left[1 - \frac{y_{O_2} (1 - x_{O_2} - x_{CO_2})}{x_{O_2} (1 - y_{O_2} - y_{CO_2})} \right] \quad (1)$$

$$QCO_2 [gl^{-1}h^{-1}] = \frac{V' p^N x_{CO_2} M_{CO_2}}{V_F RT^N} \left[\frac{y_{CO_2} (1 - x_{O_2} - x_{CO_2})}{x_{CO_2} (1 - y_{O_2} - y_{CO_2})} - 1 \right] \quad (2)$$

Der respiratorische Quotient RQ ergibt sich aus den stoffmengenbezogenen Größen $qO_2 = QO_2/M_{O_2}$ sowie $qCO_2 = QCO_2/M_{CO_2}$ und ermöglicht eine Aussage über den Grad der Sauerstofflimitierung:

$$RQ = \frac{qCO_2}{qO_2} \quad (3)$$

V' [$l\ h^{-1}$]	Volumenstrom
V_F [l]	Flüssigkeitsvolumen
p [bar]	Druck
R	allgemeine Gaskonstante, 8,314 [$J\ K^{-1}\ mol^{-1}$]
T [K]	Temperatur
M [$g\ mol^{-1}$]	molare Masse
X	Stoffmengenanteil in der Zuluft $X_{O_2} = 0,20946$ $X_{CO_2} = 0,00033$
Y	Stoffmengenanteil in der Abluft
N	Normzustand (273,15 K, 1 bar)

10.4 Wachstumsrate

Für eine sich exponentiell vermehrende Bakterienpopulation gilt folgende Differentialgleichung:

$$\frac{dX}{dt} = \mu * X \quad (4)$$

X = Zellmasse

μ = Wachstumsrate

Bei unlimitiertem Wachstum ist die Wachstumsrate maximal und konstant $\mu = \mu_{\max}$. Die Gleichung kann integriert und nach μ_{\max} aufgelöst werden.

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(X^{t_2}) - \ln(X^{t_1})}{t_2 - t_1} \quad (5)$$

11. Analytik

11.1 Bestimmung der Glukosekonzentration

800 μ l Kulturüberstand werden mit 200 μ l 1 M Phosphatpuffer pH 7,0 neutralisiert und gut durchmischt. Die Glukosebestimmung wird mit dem Accutend® Glucose Analyzer (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Bei diesem Test wird die Umsetzung mit Glukoseoxidase reflektionsphotometrisch verfolgt. Verdünnungen werden bei Bedarf mit destilliertem Wasser hergestellt. Der Meßbereich erstreckt sich von 0 - 6 g l⁻¹.

11.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

11.2.1 Zellaufschluß

a) NaOH-Aufschluß

Zur Bestimmung des Zellproteins wird ein Zellaufschluß nach Näveke und Tepper [Näveke & Tepper 1986] durchgeführt. Hierfür werden 1 ml Kultursuspension 15 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415). Das Pellet wird in 1 ml 1 N Natronlauge

resuspendiert, 20 min im Thermoblock auf 95°C erhitzt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur 5 min intensiv durchmischt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wird zur Proteinbestimmung eingesetzt.

b) Glaskugelaufschluß

Es werden 1 ml Kultursuspension 15 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit 0,5 ml Glaskugeln (SM4; 0,75 mm) und 1 ml 50 mM Phosphatpuffer (pH 7,6) für 20 min in einer Schüttelmaschine (Retsch) aufgeschlossen. Anschließend werden die Glaskugeln durch Zentrifugation (Eppendorf Zentrifuge 5415) bei 13000 Upm für 10 min von der Lösung abgetrennt. Der Überstand wird zur Proteinbestimmung eingesetzt.

11.2.2 Proteinbestimmung

a) Bradford [Bradford 1976]

Reagenz:

100	mg	Coomassie Blue G250
50	ml	Methanol
100	ml	H ₃ PO ₄
auf 1000 ml mit dest. H ₂ O auffüllen		

(Aufbewahrung: kühl und dunkel)

200 µl Probe und 800 µl Reagenz werden in einer Küvette gemischt und nach 10 min Wartezeit bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen. Diese Methode umfaßt einen Meßbereich bis maximal 100 µg ml⁻¹ Protein. Verdünnungen bei höheren Proteinkonzentrationen werden mit 0,9 %ige NaCl-Lösung vorgenommen. In der Blindprobe wird das Probenvolumen durch 200 µl 0,9 %ige NaCl-Lösung ersetzt. Die Kalibration erfolgt mit Rinder-Serum-Albumin (BSA) als Standardprotein.

b) Lowry [Lowry *et al.* 1951; Hartree 1972]

Reagenzien:

Lösung A:	20 g l ⁻¹ Na ₂ CO ₃ in 0,1 N NaOH
Lösung B:	10 g l ⁻¹ CuSO ₄ * 5 H ₂ O
Lösung C:	20 g l ⁻¹ Kalium-Natriumtartrat
Lösung D:	Folin-Reagenz, 1:2 verdünnt

Gebrauchsreagenz: täglich frisch zubereiten durch Mischen von 0,5 ml Lösung C mit 50 ml Lösung A und anschließender Zugabe von 0,5 ml Lösung B

200 µl einer Probe werden mit 2 ml Gebrauchsreagenz versetzt, gemischt und bei 30°C für 10 min inkubiert. Anschließend werden 200 µl Lösung D hinzugefügt, gemischt und weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Die Extinktion der Probe wird bei 750 nm mit einem Spektralphotometer gegen einen Blindwert mit 200 µl H₂O statt Probe gemessen. Die Kalibration erfolgt für einen Bereich von 50 bis 500 mg l⁻¹ mit Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein.

11.3 Bestimmung der Ammoniumkonzentration

a) Ammoniumbestimmung nach Fawcett und Scott [Fawcett & Scott 1960]

Reagenzien:

Lösung A:	9,98 g l ⁻¹ Phenol + 0,0506 g l ⁻¹ Na-Nitroprussid
Lösung B:	0,5 ml 13 %ige Na-Hypochloritlösung + 25 ml H ₂ O

40 µl Kulturüberstand werden mit 1 ml Lösung A in einem Reagenzglas gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Lösung B gestartet. Die Lösungen werden 15 min bei 37 °C inkubiert, 15 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend bei 546 nm gegen eine Blindprobe (Probe durch H₂O ersetzt) mit einem Spektralphotometer die Extinktion gemessen. Durch Aufnahme einer Kalibrationsgeraden mit Ammoniumsulfat werden die Probenkonzentrationen ermittelt (Konzentrationsbereich von 0,2 bis 2,0 mmol l⁻¹).

b) Ammoniumbestimmung Merckoquant 10024

Zur halbquantitativen Bestimmung von Ammoniumionen wird der Ammonium-Test Merckoquant[®] 10024 (Merck) verwendet. Dem Test liegt die spezifische Reaktion nach Neßler zugrunde.

11.4 Bestimmung der Stickstoffkonzentration

Die Gesamtstickstoffkonzentration im Kulturüberstand wird mit dem Fertigtest LATON[®] Küvettentest LCK 338 (Dr. Lange) bestimmt. Anorganisch und organisch gebundener Stickstoff wird durch Aufschluß mit Peroxodisulfat zu Nitrat oxidiert. Nitrationen reagieren in schwefel- und phosphorsaurer Lösung mit 2,6-Dimethylphenol zu Nitrophenol, dessen Extinktion bei 370 nm mit einem Dr. Lange-Photometer gemessen wird. Der Meßbereich erstreckt sich von 25 - 125 mg l⁻¹ Gesamtstickstoff.

11.5 Bestimmung der Phosphatkonzentration

Die Bestimmung der Phosphatkonzentration im Kulturüberstand erfolgt mit dem Phosphor-Test (PMB) 14848 (Merck). Orthophosphat-Ionen bilden mit Molybdat-Ionen in schwefelsaurer Lösung Molybdatophosphorsäure. Diese wird mit Ascorbinsäure zu Phosphormolybdänblau reduziert, das dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 712 nm bestimmt wird.

11.6 Bestimmung der Aminosäurekonzentrationen

Die Messung der Aminosäurekonzentrationen im Kulturüberstand erfolgt mit einer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie-Anlage (HPLC). Dabei werden die Aminosäuren nach einer Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd-Mercaptoethanol (OPA-MCE) auf einer Säule aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritäten und der daraus resultierenden Wanderungsgeschwindigkeiten aufgetrennt. Die Substanzen werden anhand ihrer fluoreszierenden Eigenschaften detektiert⁴.

⁴ Ich danke Frau M. Weiss, Institut für Technische Chemie, Uni Hannover, für die Durchführung der Aminosäurekonzentrationsbestimmungen.

12. Aufreinigung von Metaboliten

12.1 Extraktion

Nach Beendigung der Kultivierung wird die gesamte Kulturbrühe mit einer Zentrifuge (Varifuge F, Heraeus) für 20 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, anschließend zwei mal mit Essigsäureethylester extrahiert. Nach Ansäuerung mit HCl auf pH 3 wird nochmals mit Essigsäureethylester extrahiert. Das Zellsediment wird mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert (20 min, 13000 Upm). Das Sediment wird über Nacht mit einem Aceton/Essigester-Gemisch (1:5) unter ständigem Rühren aufgeschlossen. Anschließend werden die noch verbleibenden Schwebeteilchen mittels Faltenfilter (Schleicher & Schuell) abfiltriert, und das Filtrat einrotiert.

12.2 Chromatographische Trennung

Die Aufreinigung der isolierten Substanzen erfolgt sowohl durch Säulen- als auch durch Dickschichtchromatographie. In den meisten Fällen werden mehrere Schritte hintereinander durchgeführt, die sich aus einer Kombination beider Verfahren ergeben.

12.2.1 Säulenchromatographie

Zur Aufreinigung der Zell- und Überstandsextrakte werden sowohl Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) als auch RP-Material (Reverse Phase, Merck, Darmstadt) verwendet. Die Extraktmenge auf der Säule beträgt maximal 1 % des Säulenmaterials. Das Elutionsmittel wird für die jeweilige Trennung vorher ausgetestet.

12.2.2 Dickschichtchromatographie

Zur Trennung von Milligrammengen werden dicke Schichten (1–3 mm) verwendet. Die Probe wird in geschlossener Front an der Startlinie aufgetragen und nach dem Verdunsten des Lösungsmittels in einer Dünnschichtkammer mit geeignetem Elutionsmittel entwickelt. Zur

Sichtbarmachung der getrennten Zonen wird die Platte bis auf einen beiderseits 2 cm breiten Randstreifen abgedeckt und besprüht. Anschließend werden die substanzenthaltenden nicht besprühten Zonen mit einem Spatel entfernt und die Produkte mit geeignetem Lösungsmittel extrahiert.

13. Analytische Methoden zur Struktur von Metaboliten

13.1 Produktkontrolle mittels Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wird zur Identifizierung von Substanzen, zur Reinheitsprüfung von Aufreinigungsfractionen und zur qualitativen Verfolgung der Produktbildung angewendet. Als stationäre Phase wird Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt) verwendet und als mobile Phase ein Gemisch aus CHCl₃, Methanol und dest. H₂O im Verhältnis 65+15+2.

Die einrotierten organischen Extrakte werden in 2 ml Lösungsmittel resuspendiert und davon jeweils 10 µl für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt.

Zur optischen Detektion der Extraktkomponenten werden neben der Betrachtung bei UV-Licht (254 nm und 366 nm) folgende Sprühreagenzien verwendet:

- a) Anisaldehyd [Stahl & Kaltenbach 1961]
(Frisch bereitete Lösung aus 0,5 ml Anisaldehyd in 50 ml Eisessig unter Zusatz von 1 ml konzentrierter Schwefelsäure; nach dem Ansprühen auf 100°C bis zur maximalen Farbintensität der Flecken erwärmen; breites Farbspektrum von grün bis violett)
- b) α-Naphthol [Jacin *et al.* 1965]
(Lösung aus: 10,5 ml α-Naphthollösung (15 % in Ethanol), 6,5 ml konzentrierte Schwefelsäure, 40,5 ml Ethanol und 4 ml H₂O; nach dem Ansprühen 3 – 6 min auf 100°C erwärmen; Zuckerverbindungen erscheinen als lila schwarze Spots)
- c) Methanol/Schwefelsäure [Anthony *et al.* 1963]
(Lösung aus: Methanol und H₂SO₄, 1+1; nach dem Ansprühen 3 – 6 min auf 100°C erwärmen; organische Verbindungen erscheinen als braune Spots)

13.2 NMR-Spektroskopie

Die Aufnahme von NMR-Spektren der aufgereinigten Substanzen erfolgt mit einem 300 K Bruker ARX 400 NMR-Spektrometer und einem DPX 600 NMR-Spektrometer⁵. Es werden ^1H -Standardspektren und ^1H -breitbandentkoppelte ^{13}C -Spektren aufgenommen. Die Bestimmung der Multiplizitäten der ^{13}C -Signale wird anhand von DEPT-Spektren vorgenommen. Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgt mit Hilfe zweidimensionaler (^1H , ^1H)-und (^1H , ^{13}C)-korrelierter Spektren. Es werden ausschließlich deuterierte Lösungsmittel verwendet. Als interner Standard dient Tetramethylsilan.

13.3 Gaschromatographie/Massenspektroskopie

Zur vollständigen qualitativen Charakterisierung der Fettsäuren werden diese nach Methanolyse einer kombinierten gaschromatographischen-massenspektrometrischen Analyse unterzogen⁶. Es wird ein Kapillargaschromatograph Modell HRGC 5160 mega series der Fa. Carlo Erba, Hofheim/Ts eingesetzt, der mit einem Quadropol-Massenspektrometer, Modell MAT 4515 (Finnigan, USA) gekoppelt ist.

Die Analyse des Fettsäuremethylestergemisches zur Bestimmung des Fettsäureprofils erfolgte gaschromatographisch unter Verwendung des 5898A Microbial Identification System (Microbial ID, Nowark, DE 19711 U.S.A.)⁷.

13.4 Massenspektroskopie

Die Bestimmung der Molmassen erfolgt mit dem triple Quadropol-Massenspektrometer, Modell MAT TSQ700 (Finnigan, USA). Die Ionisierung erfolgt mittels Elektronenspray-Verfahren⁸.

⁵ Ich danke Herrn Dr. V. Wray, Institut für Molekulare Strukturforchung, GBF Braunschweig, für die Aufnahme der NMR-Spektren.

⁶ Ich danke Herrn Dr. L. Witte, Institut für Organische Chemie, TU Braunschweig, für die Durchführung der GC/MS Messungen.

⁷ Ich danke Herrn Prof. Dr. R. M. Kroppenstedt, DSMZ Braunschweig, für die Ermittlung des Fettsäureprofils.

⁸ Ich danke Herrn Dr. M. Nimtz, Institut für Molekulare Strukturforchung, GBF Braunschweig, für die Aufnahme der MS-Spektren.

13.5 FAB-Massenspektroskopie

Zur Bestimmung von Molmassen polarer Verbindungen werden positive und negative Fast Atom Bombardement-Massenspektren (Massenspektrometer Modell MAT 8430, Finnigan, USA) aufgenommen⁹. Als Matrix wird Glycerin eingesetzt.

13.6 IR-Spektroskopie

Die Energie der meisten Molekülschwingungen entspricht dem infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Funktionelle Gruppen haben charakteristische Schwingungsfrequenzen, die in definierte Regionen des IR-Bereiches fallen und somit eine Identifizierung der Verbindungsklasse ermöglichen. Die Probe wird als KBr-Pressling in einem FT-IR-Spektrometer Nicolet 320 über einen Wellenzahlenbereich von 400 bis 4000 cm^{-1} gemessen¹⁰.

⁹ Ich danke Herrn Dr. U. Papke, Institut für Organische Chemie, TU Braunschweig, für die Aufnahme der FAB-Spektren.

¹⁰ Ich danke Frau Kadhim, Institut für Organische Chemie, TU Braunschweig, für die Aufnahme der IR-Spektren.

III. Ergebnisse

1. Screening

Aus den Schwämmen *Crella rosea*, *Pelina semitupolosa*, *Spongia officinales* und *Dysidea avara* sollten im Rahmen eines Screenings verschiedene marine Bakterien isoliert und auf Bildung biologisch aktiver Substanzen untersucht werden.

1.1 Isolierung von schwammassoziierten Bakterien (Rovinj 1996)

Von den für das Screening verwendeten Medien wird im folgenden nur MB-Agar als Screening-Medium vorgestellt und näher untersucht, da aufgrund der großen Probenanzahl in dieser Arbeit nicht mehr bearbeitet werden konnte. Tab. III.1 stellt eine Übersicht der auf MB-Agar erhaltenen Bakterienisolate dar.

Tab. III.1: Bakterienisolate aus Schwammauspressungen von MB-Agar (Rovinj 1996).
Es wurden die Schwämme *Crella rosea* (Cr), *Pelina semitupolosa* (Ps), *Spongia officinales* (So) und *Dysidea avara* (Da) als Ausgangsmaterial verwendet.

Isolat	Aussehen	Form	weitere Eigenschaften
MH-Cr 6.1	weiß	runde Sporen	
MH-Cr 6.2	violett	Staphylokokken/Diplokokken	
MH-Cr 6.3	orange/gelb	Stäbchen	gramnegativ Oxidase pos.
MH-Cr 6.4	weiß	Mono- oder Diplokokken	
MH-Cr 6.5	beige/grünlich	Stäbchen	gramnegativ, beweglich Oxidase pos.
MH-Ps 7.1	weiße	ovale Sporen	
MH-Ps 7.2	farblos	Stäbchen	gramnegativ
MH-Ps 7.3	weiß	Stäbchen	
MH-So 8.1	weiß	Stäbchen	
MH-So 8.2	weiß	ovale Sporen	
MH-So 8.5	braun/ schleimig	Monokokken	grampositiv Oxidase pos.
MH-Da 10.2	beige	ovale Sporen	Oxidase pos.
MH-Da 10.3	weiß	Kurzstäbchen	
MH-Da 10.5	farblos	Kurzstäbchen	Oxidase pos.

Aus vier verschiedenen Schwämmen wurden von MB-Agar 14 verschiedene Bakterienstämme isoliert. Bei 50 % der Bakterien handelt es sich um Stäbchen, 29 % sind Sporen und 21 % eine Form von Kokken.

Häufig beobachtete Korrelationen zwischen Pigmentbildung und Wirkstoffproduktion bei Bakterien wurden bereits mehrfach im marinen mikrobiellen Bereich bestätigt [Yokoyama & Miki 1995]. Neben überwiegend beige/weißen Bakterien wurden hier nur aus dem Schwamm *Crella rosea* ein gelbes und ein violettes Isolat gewonnen. Weiterhin wurde ein braunschleimiger Stamm aus dem Schwamm *Spongia officinales* isoliert. Bei den braunen Pigmenten handelt es sich vermutlich wie auch bei einigen anderen marinen Mikroorganismen um Melanine, die häufig bei hohen Tyrosinkonzentrationen gebildet werden [Weiner 1997, Ivanova *et al.* 1998].

Erste Anhaltspunkte über die Produktion von antimikrobiellen Substanzen lieferte der Overlay-Test. Lediglich die Bakterienisolate MH-Cr 6.2, MH-Cr 6.3 und MH-So 8.5 weisen eine deutliche Wirkung gegenüber einigen Testorganismen auf. Alle drei Isolate hemmen das Wachstum von *B. megaterium*, MH-Cr 6.3 und MH-So 8.5 außerdem auch das Wachstum von *E. coli*. Zudem hemmen MH-Cr 6.2 und MH-Cr 6.3 das Wachstum der Alge *Chlorella fusca*.

1.2 Screening I nach biologisch aktiven Kulturextrakten

Zur Gewinnung von Kulturextrakten für biologische Aktivitätstests wurden die Einzelisolate in 100 ml Schüttelkolben kultiviert, extrahiert und im Plättchentest eingesetzt. Das Isolat MH-Cr 6.2 konnte in Flüssigkultur nicht zum Wachsen gebracht werden. Auch auf MB-Agarplatten war nach zweimaligem Überimpfen kein Wachstum mehr möglich. Eine Erscheinung, die bei der Kultivierung von marinen Bakterien hin und wieder zu finden ist [Gauthier & Flatau 1976]. Daher konnte der Organismus im folgenden nicht mehr berücksichtigt werden.

Der Plättchentest bestätigte die Ergebnisse des Overlaytests. MH-Cr 6.3 zeigt deutlich wachstumsinhibierende Wirkung gegen *B. megaterium*, *E. coli*, *C. fusca* und außerdem auch noch gegen den Pilz *U. violacea*. Der Extrakt des Stammes MH-So 8.5 inhibiert das Wachstum von *B. megaterium* und *E. coli*. Eine weitere, jedoch nur schwache Wachstumsinhibierung wird durch den Extrakt des Isolates MH-Da 10.2 bei der Alge *C. fusca* beobachtet. Die Rohextrakte aller Bakterienisolate wurden auf zytotoxische Wirkung an der

Universität in Mainz und auf neuroprotektive Wirkung bei der Fa. Merz, Frankfurt getestet. Bei den eingesetzten Konzentrationen wurden keine biologischen Aktivitäten festgestellt.

1.3 Isolierung von Bakterien aus dem Schwamm *Crella rosea* und seiner natürlichen Umgebung (Rovinj 1997)

In einem zweiten Screening sollte die Bakterienpopulation des Schwammes *Crella rosea* genauer untersucht und mit der Bakterienpopulation der natürlichen Schwammumgebung verglichen werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob das Isolat MH-Cr 6.3, das im Screening I aus *C. rosea* isoliert wurde, ein Jahr später in Screening II wieder gefunden wird. Die Erfahrungen aus Screening I und die Tatsache, daß Screening II im eigenen Labor durchgeführt wurde, führten zu einer anderen verbesserten Vorgehensweise. Es wurden 1997 aus dem Schwamm *Crella rosea* mehr Bakterien isoliert als ein Jahr zuvor. In Tab. III.2 sind alle neuen Bakterienisolate aufgeführt.

Der Vergleich der morphologischen und physiologischen Charakteristika zeigt, daß bis auf Isolat E1.14 und H3.4 alle anderen Isolate Unterschiede aufweisen. Somit ergibt sich für Screening II eine Vielfalt von 17 schwammassoziierten Bakterien. Bei 59 % der Bakterien handelt es sich um gramnegative und bei 41 % um grampositive Stämme. Die häufigste Wachstumsform ist die stäbchenförmige (82 %), die neben der kugelförmigen (18 %) zu finden ist. Die Bildung von roten oder gelben Pigmenten wird bei 53 % der Stämme beobachtet.

Bei der Untersuchung der natürlichen Schwammumgebung wurden nach Vergleich von morphologischen und physiologischen Charakteristika 8 Isolate mit unterschiedlichen Eigenschaften gefunden (Daten nicht gezeigt), wobei 75 % den gramnegativen und 25 % den grampositiven Bakterien zuzuordnen sind (Tab. III.3). Kein Bakterienisolat aus dem Schwamm ist identisch mit einem Isolat aus dem Umgebungswasser.

Eine Ergänzung der morphologischen und physiologischen Eigenschaften stellt der qualitative Vergleich des Produktspektrums dar. Um eine eindeutige Aussage über das Vorhandensein von MH-Cr 6.3 in Screening II machen zu können, wurden alle Bakterienisolate mit gelb/oranger Pigmentbildung kultiviert, extrahiert und anschließend das Produktspektrum

verglichen. Das Produktspektrum von MH-Cr 6.3 unterscheidet sich von allen kultivierten Bakterien (Daten nicht gezeigt). Der Stamm MH-Cr 6.3 wurde im zweiten Screening nicht wiedergefunden.

Tab. III.2: Bakterienisolate aus dem Schwamm *Crella rosea* (Rovinj 1997).

1. Isolate von MB-Agar nach verschiedenen Inkubationszeiten: A = 19 h, B = 34 h, C = 116 h, D = 141 h, E = 164 h, F = 188 h.
2. Isolate angereichert in Flüssigmedium und anschließend von MB-Agar nach verschiedenen Inkubationszeiten isoliert: G = 2 h, 41 h Agar; H = 21 h, 41 h Agar.

Isolat	Aussehen	Form	Gram-Verhalten	Oxidase-Test	Gattung/Species (Becton Dickinson)
A1.1	beige	Stäbchen	pos.	pos.	<i>Aeromonas hydrophila</i>
B1.2	orange/ gelb	Stäbchen	pos.	neg.	-
B1.3	gelb	Kokken	pos.	neg.	-
B1.4	orange	dünne Stäbchen (Nadeln)	neg.	neg.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
C1.5	beige	Stäbchen	neg.	pos.	<i>Psteurella multocida</i> <i>Morexella spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>
C1.6	rot	Stäbchen	neg.	neg.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
C1.8	orange	Stäbchen	neg.	neg.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
C1.9	gelb	Stäbchen	neg.	neg.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
C1.11	orange/rot	Stäbchen	neg.	pos.	<i>Psteurella multocida</i> <i>Morexella spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>
D1.12	rosa	Kurz- Stäbchen	pos.	neg.	-
D1.13	braun	Stäbchen	neg.	neg.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
E1.14	weiß	Mono- kokken	pos.	neg.	-
F1.16	gelb	Stäbchen	neg.	neg.	-
F1.18	farblos	Sporen	neg.	pos.	<i>Psteurella multocida</i> <i>Morexella spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>
G3.1	beige →braun	Stäbchen	pos.	pos.	-
H3.2	gelb/ orange	dicke Kokken	pos.	neg.	-
H3.3	weiß, sternf.	dicke Stäbchen	neg.	pos.	-
H3.4	weiß, klein	Mono- kokken	pos.	neg.	-

Tab. III.3: Vergleich der Isolate aus der Schwammprobe mit denen der Wasserprobe.

¹ Bakterien isoliert von MB-Agar, ² Bakterien angereichert in Flüssigmedium und anschließend von MB-Agar isoliert.

	Schwammprobe	Wasserprobe
Bakterienisolate ¹	14	6
Bakterienisolate ²	4	3
verschiedene Bakterien	17	8
grampositive Bakterien	7	2
gramnegative Bakterien	10	6

1.4 Screening II nach biologisch aktiven Kulturextrakten

1.4.1 Antimikrobielle Metabolite

Alle 17 Bakterienisolate aus *Crella rosea* wurden kultiviert, der Überstand und die Zellen getrennt extrahiert und im Plättchentest eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. III.4 dargestellt. Die positiven Extrakte verteilen sich auf sechs verschiedene Stämme, wobei die Wirkung von zwei Extrakten nur sehr schwach ist.

Tab. III.4: Antimikrobielle Aktivitäten bei 17 getesteten Bakterienisolaten aus dem Schwamm *Crella rosea* im Plättchentest.

Alle Bakterienisolate wurden in MB-Medium kultiviert und anschließend Zellen und Überstand getrennt extrahiert. Die antimikrobiellen Aktivitäten der Extrakte wurden mittels Plättchentest ermittelt. Als Blindprobe wurde reines Lösungsmittel getestet.

Testorganismus	positive Zellextrakte	positive Überstandsextrakte
<i>B. megaterium</i>	2	4
<i>E. coli</i>	0	0
<i>M. microspora</i>	0	0
<i>E. repens</i>	0	1
<i>C. cucumerinum</i>	0	0
<i>U. violacea</i>	3	0
<i>F. oxysporum</i>	0	0
<i>C. fusca</i>	4	0

1.4.2 Toxische Metabolite

Als weitere Screeningmethode wurde der Biolumineszenztest durchgeführt. Alle 34 Überstands- und Zellextrakte wurden qualitativ auf Toxizität untersucht. Die visuelle Auswertung des Tests zeigte, daß bei fast allen Extrakten eine Reduktion der Biolumineszenz durch Fettsäuren oder ähnlich unpolare Substanzen erfolgt. Bei einigen Extrakten sind weiterhin Aktivitäten im polaren Bereich zu erkennen. Der Überstandsextrakt C1.6 zeichnet sich beispielsweise durch einen sehr auffälligen Fleck im Bereich von $R_f = 0,5$ aus (s. Abb. II.4; Bahn E).

2. Bakterienisolat Mt 5.1 aus dem Schwamm *Mycale tunicata*

In einem parallel durchgeführten Screening (Rovinj 1996, C. Wicke) wurden aus dem Schwamm *Mycale tunicata* (Abb. III.1) mehrere Bakterien isoliert, von denen ein Isolat (Mt 5.1) in dieser Arbeit näher untersucht wurde. Der Extrakt des Bakterienisolates Mt 5.1 zeigte im Screening nach antimikrobiellen Substanzen eine auffällig starke inhibierende Wirkung gegen *B. megaterium* und *U. violacea*. Daher wurde das Bakterium Mt 5.1 für weitere Untersuchungen ausgewählt. Neben der Strukturaufklärung des biologisch aktiven Metaboliten sowie dessen qualitative und quantitative Wirkung, wurden Untersuchungen zur Identifizierung des Mikroorganismus durchgeführt.



Abb. III.1: Schwamm *Mycale tunicata* (kroatische Adriaküste, Rovinj 1996).

2.1 Charakterisierung des Bakteriums Mt 5.1

Bei dem isolierten braunblauen Bakterium handelt es sich um ein bewegliches gramnegatives Stäbchen, das eine Länge von 1,5 – 3,0 μm und eine Breite von 0,7 – 0,8 μm besitzt. Der Mikroorganismus gehört aufgrund seiner Cytochromoxidase-Aktivität zur Gruppe der oxidativ-fermentativen stäbchenförmigen Bakterien. Zur Identifizierung dieser Bakteriengruppe über physiologische und biochemische Merkmale wurde das Testsystem BBL[®]

Oxi/FermTM Tube II verwendet. Anhand des erhaltenen ID-Wertes ergaben sich mittels CCIS folgende mögliche Species:

- *Pseudomonas putida*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Pseudomonas fluorescens*

Eine genaue Identifizierung des Mikroorganismus durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bestätigte aufgrund des Profils der zellulären Fettsäuren und einer partiellen Sequenzierung der 16S rRNA eine Ähnlichkeit von 99,8 % zu *Pseudomonas aeruginosa*. Das Bakterienisolat Mt 5.1 wird im folgenden mit *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) bezeichnet.

Ps. aeruginosa wurde im Schüttelkolben in MB-Medium bei 27°C kultiviert. Nach 51 h war die maximale optische Dichte (546 nm) von 2,2 erreicht. Das Wachstum in MB-Medium wurde durch Zusatz von 10 g l⁻¹ Glukose verbessert. Die Kultur erreicht bereits nach 43 h eine optische Dichte von 3,9 (Daten nicht gezeigt).

2.2 Strukturaufklärung und Wirkung der biologisch aktiven Substanz

Erste Anhaltspunkte zur wirksamen Substanz lieferte der DC-Overlay-Test. Im Bioautogramm (Abb. III.2) sind sehr große Hemmhöfe sichtbar. Sowohl im Zellextrakt als auch im Überstandsextrakt sind antibakterielle Wirkungen detektierbar. Die Größe der Hemmhöfe und die Lage der Spots auf der entsprechenden DC führen zu der Vermutung, daß es sich hier um mehrere verschiedene antimikrobielle Substanzen handelt.

Zur Aufklärung der Molekülstruktur wurden 2 l Bakterienkultur extrahiert und über Säulenchromatographie aufgereinigt. Es wurden folgende Aufreinigungsschritte durchgeführt:

5,5 × 3 cm Kieselgel 60; Laufmittel: Cyclohexan/MTBE; (50+50; 40+60; 0+100).

5,5 × 3 cm Kieselgel 60; Laufmittel: MTBE/Methanol; (50+50; 0+100).

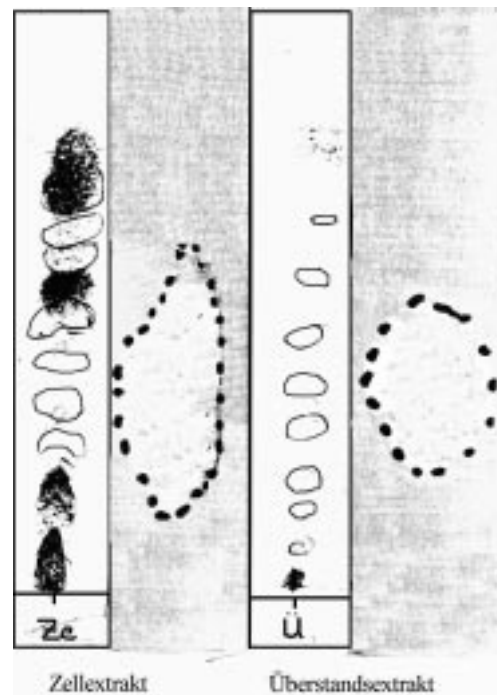


Abb. III.2: Bioautogramm des Zell- und Überstandsextraktes von *Ps. aeruginosa*.

Jeweils für Zellextrakt und Überstandsextrakt: links: DC-Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufmittel: CHCl₃/Methanol/H₂O (65/15/2; v/v/v); Detektionsmittel: α -Naphthol
rechts: NB-Agarplatte aus DC-Overlay-Test mit *B. megaterium* als Testorganismus.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung wurde die Molekülstruktur einer antimikrobiellen Substanz durch Aufnahme von ¹H-NMR-, ¹³C-NMR- und Massen-Spektren bestimmt. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tab. III.5 zusammengefaßt. Durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den von Syldatk beschriebenen Daten [Syldatk 1984] wurde die Struktur endgültig bestätigt. Bei dem Molekül handelt es sich um einen Ester aus zwei β -Hydroxydekansäuremolekülen, bei dem die zweite β -OH-Gruppe mit einem Molekül Rhamnose über die OH-Gruppe an Position 1 eine glykosidische Bindung ausbildet. Es handelt sich hier um die Struktur von Mono-rhamnosyl-di-3-hydroxydekansäure (Abb. III.3).

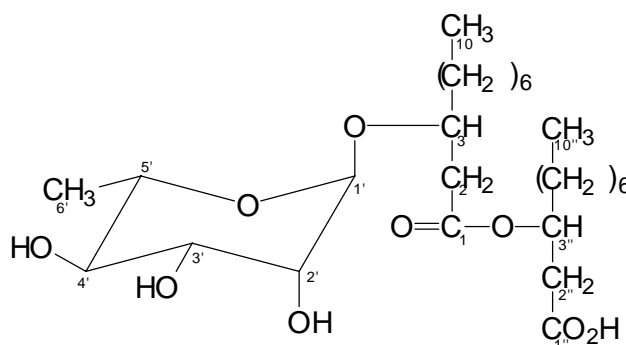


Abb. III.3: Molekülstruktur von Mono-rhamnosyl-di-3-hydroxydekansäure.

Summenformel: $C_{26}H_{48}O_9$

Molekulargewicht: $M = 504 \text{ g/mol}$

Tab. III.5: NMR-Strukturdaten von Mono-rhamnosyl-di-3-hydroxydekansäure.

	chemische Verschiebung	Kopplung		chemische Verschiebung	Kopplung
C1	172,6	s			
C2	42,2	t	H2	2,4	
C3	71,4	d	H3	4,2	m
C4	32,0	t	H4A/H4B	2,4-2,5	m
C5	25,5	t			
C6	30,0	t			
C7	29,8	t			
C8	32,0	t			
C9	22,9	t			
C10	14,2	q			
C1'	96,1	d	H1'	4,8	
C2'	73,0	d	H2'	3,8	m
C3'	73,1	d	H3'	3,8	m
C4'	72,0	d	H4'	3,3-3,4	m
C5'	68,5	d	H5'	3,7	m
C6'	17,3	q	H6'	1,3	m
C1''	178,2	s			
C2''	40,2	t	H2''	2,4	m
C3''	71,6	d	H3''	5,3-5,5	m
C4''	35,0	t	H4A''/H4B''	2,4-2,5	m
C5''	24,8	t			
C6''	29,5	t			
C7''	29,4	t			
C8''	32,0	t			
C9''	22,9	t			
C10''	14,2	q			

MS (ESI + Q1MS)

$m/z = 527,3$ ($[M-Na]^+$)

$m/z = 503,4$ ($[M-H]^-$)

Um eine Aussage über die antimikrobiellen Aktivitäten machen zu können, wurde das aufgereinigte Produkt in verschiedenen Konzentrationen im Plättchentest eingesetzt. Bereits 100 µg reine Substanz zeigen eine deutliche Inhibierung des Wachstums der grampositiven Bakterien (*B. megaterium* und *S. aureus*). Das Wachstum der gramnegativen Bakterien *Ps. aeruginosa* und *E. coli* wird bei ≤ 300 µg Substanz nicht gehemmt. Bei den beiden Pilzen *U. violacea* und *M. microspora* ist erst ab 200 µg Rhamnoselipid eine geringe Inhibierung des Wachstums zu beobachten. Bei den anderen getesteten Pilzen erfolgt bis 300 µg keine Wachstumsinhibierung. Die Alge *C. fusca* hingegen wird bereits durch 100 µg gehemmt (Tab. III.6).

Tab. III.6: Hemmhofdurchmesser (mm) von Rhamnoselipid im Plättchentest.

Es wurden jeweils 10 µl Rhamnoselipid als Ethylacetatlösung auf ein Filterplättchen gegeben. Als Blindprobe wurde Ethylacetat ohne Substanz eingesetzt.

Testorganismus	100 µg	200 µg	300 µg
<i>B. megaterium</i>	11,5	12,5	15,5
<i>S. aureus</i>	10	12	14
<i>Ps. aeruginosa</i>	neg.	neg.	neg.
<i>E. coli</i>	neg.	neg.	neg.
<i>U. violacea</i>	neg.	8	10
<i>F. oxysporum</i>	neg.	neg.	neg.
<i>E. repens</i>	neg.	neg.	neg.
<i>M. microspora</i>	neg.	8	9
<i>C. cucumerinum</i>	neg.	neg.	neg.
<i>C. fusca</i>	10	11	13

Tab. III.7: Wirkung von Rhamnoselipid.

Quantitative Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung mittels Röhrchentest.

Testorganismus	IC ₅₀ [µg ml ⁻¹]	MHK [µg ml ⁻¹]
<i>B. megaterium</i>	27	64
<i>S. aureus</i>	27	32

Zur Einschätzung der Wirkung und zum Vergleich mit kommerziellen Antibiotika (s. Kap. IV) wurde der IC_{50} -Wert und die minimale Hemmkonzentration (MHK) des Rhamnoselipids für grampositive Bakterien bestimmt. Der IC_{50} beträgt für beide Teststämme $27 \mu\text{g ml}^{-1}$. Die MHK liegt für *B. megaterium* bei $64 \mu\text{g ml}^{-1}$ und für *S. aureus* nur bei $32 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Tab. III.7).

Das aufgereinigte Rhamnoselipid wurde für alle externen Aktivitätstests zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse sind in Tab. III.8 zusammengestellt. Außer einer schwachen zytotoxischen Wirkung, die bei einer Konzentration von $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ am Beispiel des Krebses *A. salina* nach 48 h beobachtet werden konnte, zeigt das Rhamnoselipid keine weiteren biologischen Aktivitäten.

Tab. III.8: Übersicht der biologischen Aktivitäten aus extern durchgeführten Tests.

Test	Wirkung
zytotoxisch (L5178 Y Zellen)	$\geq 10 \mu\text{g ml}^{-1}$
neuroprotektiv	$\geq 300 \mu\text{g ml}^{-1}$
zytotoxisch (<i>A. salina</i>)	95% nach 48 h
nematozid (<i>C. elegans</i>)	$\geq 500 \mu\text{g ml}^{-1}$
antiviral	neg.
antitumoral:	$10 \mu\text{g ml}^{-1}$
CDK4	-44 %
CDK2	+10 %
PDGF-Rb-TK	-12 %
EGF-R-TK	-39 %
ErbB2-TK	-18 %
FGF-R1-TK	-44 %
IGF-1-R-TK	-14 %
Ins-R-TK	-45 %
PKC-g	-33 %
PKC-e	-26 %
JAK2	-31 %

+ Aktivierung

- Inhibierung

Auf die Strukturaufklärungen weiterer Metabolite des Stammes *Ps. aeruginosa* wurde in dieser Arbeit verzichtet, da der Stamm und verschiedene Metabolite bereits bekannt und beschrieben worden sind [Jayatilake *et al.* 1995].

3. Bakterienisolat MH-Cr 6.3 aus dem Schwamm *Crella rosea*

Aus den erhaltenen Ergebnissen aus Screening I und Screening II wurde ein Bakterium ausgewählt, das in Bezug auf Wirkstoff, Produktion und Wachstum untersucht werden sollte. Die deutlichen Hemmwirkungen des Bakterienisolates MH-Cr 6.3 im Overlay-Test und auch des Rohextraktes im Plättchentest ließen die Wahl auf diesen Mikroorganismus fallen.

3.1 Charakterisierung des Bakteriums MH-Cr 6.3

Der Stamm MH-Cr 6.3 wurde im August 1996 aus dem Schwamm *Crella rosea* isoliert. *Crella rosea* ist ein rosa bis rosa-kaminfarbener, massiger und von Kanälen durchfurchter Schwamm (Abb. III.4), der zwar auf allen tieferen Sedimentböden zu finden ist, jedoch insgesamt eher selten vorkommt [Abel *et al.* 1983].



Abb. III.4: Schwamm *Crella rosea* (kroatische Adriaküste, Rovinj 1996)

3.1.1 Morphologische Charakterisierung

Bei dem isolierten Bakterium handelt es sich um ein kurzes, bewegliches, gramnegatives Stäbchen, das eine Länge zwischen 0,9 – 1,8 μm und eine Breite von 0,7 - 0,9 μm besitzt.

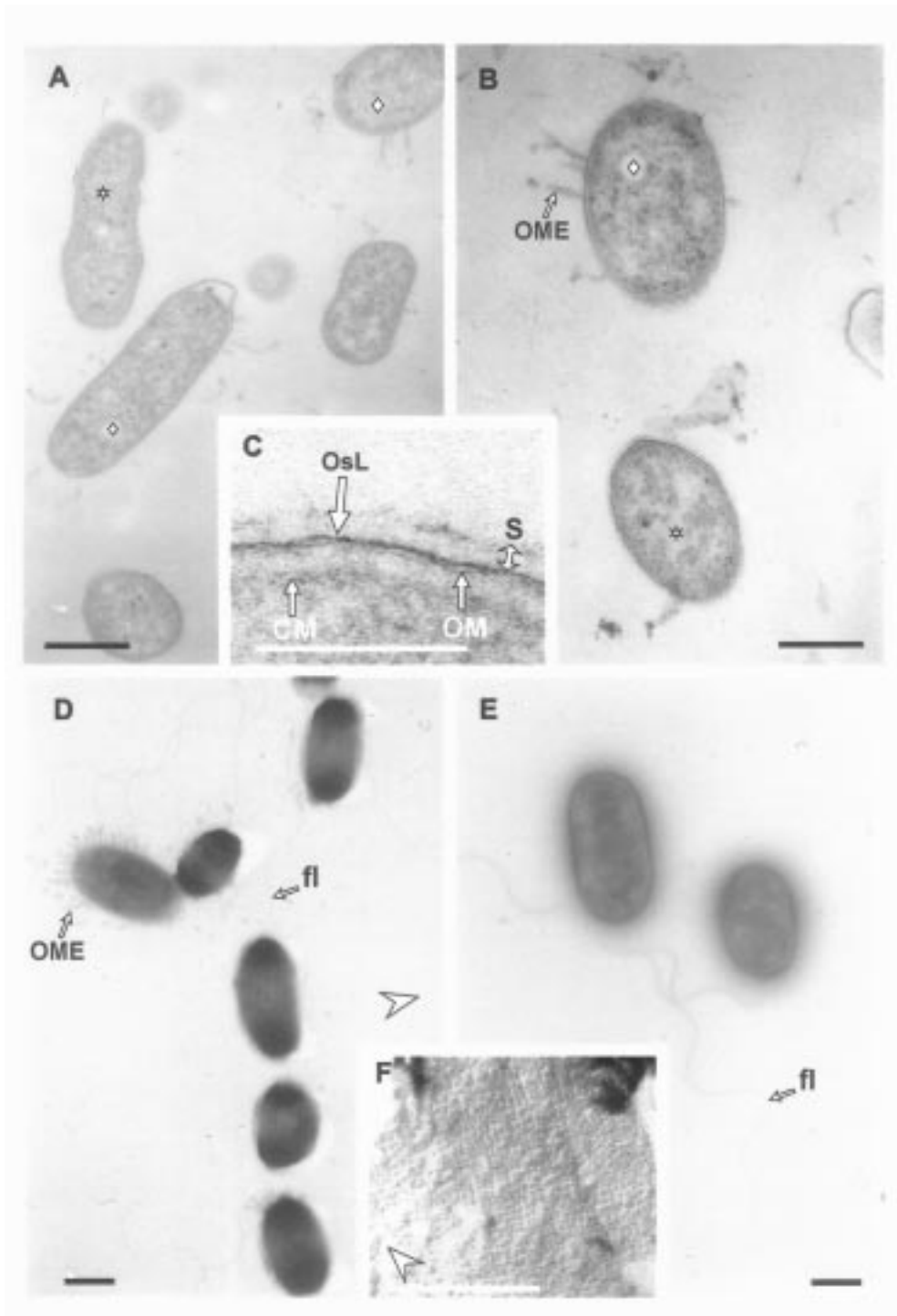


Abb. III.5: Elektronenmikroskopische Aufnahme von mittel-logarithmischen MH-Cr 6.3 Zellen.

Ultradünnschnitte der Zellen (A, B) und Details der Zellwandstruktur (C). Die Chromosomen der Bakterien sind durch einen Stern und elektronendurchlässige Einschlüsse von Speicherstoffen durch einen Rombus dargestellt. OME: Ausschleusung der äußeren Membran; OsL: osmophile Oberfläche; CM: Cytoplasmamembran; OM: Außenmembran; S: Oberflächenschicht. Monopolar, monotrich begeißelte (fl) Zellen nach Schrägbedampfung (D) und negativgefärbte Zellen (E). Ein detaillierten Auszug von orthogonalen kristallinen Proteinen auf der Oberfläche beim Gefrierbruch (F). Die Pfeilspitze (D, F) zeigt die Richtung der Pt-C Schrägbedampfung. Maßstab: A, B, D, E = 500 nm; C, F = 100 nm.

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurde die Ultrastruktur untersucht. Innerhalb der Zelle sind aggregierte DNA (elektronendurchsichtig) und Einschlüsse von Speicherstoffen (hell, elektronendurchscheinend) erkennbar. Die Zellwand besitzt den für gramnegative Bakterien typischen Aufbau mit einer zusätzlichen äußeren Membran, die eine Dicke von 3,7 bis 4,0 nm besitzt. Die äußere Oberfläche der äußeren Membran ist mit einer osmophilen Schicht (1,6 – 2,0 nm) und einer zweiten kristallinen Oberflächenschicht bedeckt. Weiterhin sind an der Oberfläche der äußeren Membran Ausschleusungspartikel erkennbar. Der Organismus ist monopolar monotrich begeißelt. Die Geißeln haben einen Durchmesser von 14 nm (Abb. III.5).

3.1.2 Physiologische und biochemische Charakterisierung

Der Stamm MH-Cr 6.3 wächst ausschließlich unter aeroben Bedingungen. Er ist Cytochromoxidase und Katalase positiv, Urease negativ, Indol negativ, Voges-Proskauer negativ und Arginin-Dihydrolase negativ. Als alleinige Substratquelle werden von den eingesetzten Substraten β -D-Glukosamide, Maltoside, und die Aminosäuren L-Valin, L-Phenylalanin, L-Glutaminsäure, L-Tryptophan, L-Arginin, L-Isoleucin, Prolin und Leucin verwertet. Keine Substratverwertung ist bei D-Glukose, D-Xylose, D-Arabinose, Laktose, Trehalose, Mannitol, Maltose, Citrat, Sorbitol, Saccharose, Fruktose, Glycerol, Cellobiose und bei Galaktosiden zu beobachten. Eine Identifizierung des Mikroorganismus mit Hilfe des BBL Oxi/Ferm Tube II war nicht möglich, da für die erhaltene ID keine Species im Identifikationssystem vorgesehen ist.

Eine der häufigsten Methoden in der Chemotaxonomie von Bakterien ist die Analyse der zellulären Fettsäuren. Die Fettsäurezusammensetzung von MH-Cr 6.3-Zellen, die auf MB-Agar gewachsen sind, ist in Tab. III.9 aufgeführt. Die Hauptkomponenten sind Hexadecensäure (9c), Heptadecensäure (9c), Hexadecensäure und Oktadecensäure (11c). Diese Komponenten machen insgesamt 73,23 % der zellulären Fettsäuren aus. Insgesamt beträgt der Anteil an gesättigten Fettsäuren 27,76 %, an einfach ungesättigten Fettsäuren 60,89 % und an Hydroxyfettsäuren 9,21 %. Es wurden keine Fettsäuren mit mehr als 18 Kohlenstoffatomen gefunden.

Tab. III.9: Profil der zellulären Fettsäuren von MH-Cr 6.3.

Mittels GC/MS und Vergleich mit entsprechenden Standards wurde das Fettsäureprofil ermittelt.

Fettsäure	% Anteil
C 10:0	0,44
C 11:0	0,35
C 10:0 3OH	1,06
unbekannt 11,798	1,56
C 12:0	0,89
C 11:0 3OH	2,10
C 12:0 iso 3OH	0,79
C 12:0 3OH	5,26
C 14:0	1,02
C 15:1 ω8c	1,39
C 15:0	2,42
C 16:0 iso	0,69
C 16:1 ω7c	29,76
C 16:0	15,13
C 17:1 ω8c	15,86
C 17:1 ω6c	1,40
C 17:0	5,86
C 18:1 ω9c	0,68
C 18:1 ω7c	11,05
C 18:0	0,95

3.1.3 Phylogenetische Charakterisierung

Da anhand der morphologischen, biochemischen und physiologischen Charakteristika von MH-Cr 6.3 noch keine Stammidentifizierung erfolgen konnte, wurden phylogenetische Untersuchungen durchgeführt. Hierfür wurde von 800 Nukleotiden die 16S rRNA-Sequenz bestimmt und mit anderen Sequenzen aus zugänglichen Datenbanken (FASTA und DSMZ interne Datenbank) verglichen. Anhand dieser Vergleiche ergab sich eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zu den beiden Stämmen *Pseudoalteromonas rubra* (FASTA: 98,95 %; DSMZ: 98,6 %) und *Pseudoalteromonas piscicida* (FASTA: 97,9 %; DSMZ: 99,8 %).

Eine engültige Aussage war aufgrund dieser Analyse auch noch nicht möglich, da sich die beiden Stämme im hinteren Bereich der 16 S rRNA in einigen Basen unterscheiden. Daher

wurden die noch fehlenden Basen mit drei überlappenden Primern sequenziert und die Vollsequenz erneut verglichen. Anhand der DSMZ-Datenbank ergeben sich die in Tab. III.10 aufgeführten Sequenzhomologien:

Tab. III.10: Sequenzhomologien durch Vergleich der Vollsequenz des Isolates MH-Cr 6.3 mit Daten der DSMZ internen Datenbank.

Vergleichsstämme	Homologie [%]
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i> (C201 CEREBOM)	99,8
<i>Pseudoalteromonas</i> strain Y [Lovejoy <i>et al.</i> 1998]	99,7
<i>Pseudoalteromonas peptidysin</i>	98,8
<i>Pseudoalteromonas rubra</i> (ATCC 29570T)	98,6

Mit Hilfe der *distance-matrix* Methode wurde ein phylogenetischer Baum erstellt, der die evolutionäre Entfernung des Isolates MH-Cr 6.3 zu anderen Species dieser Gattung und zu *E. coli* beschreibt (Abb. III.6).

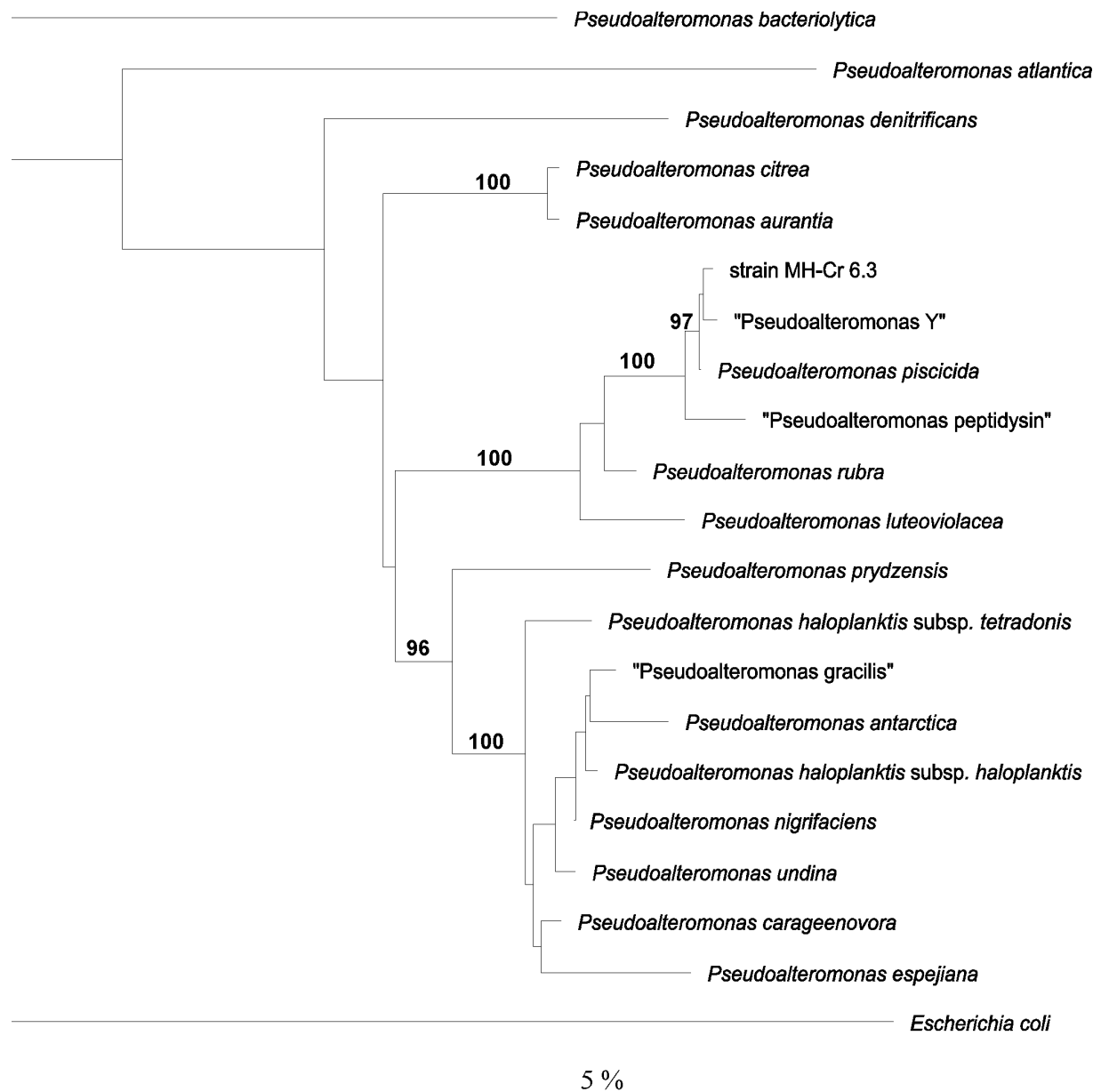


Abb. III.6: Phylogenetische Einordnung des Isolates MH-Cr 6.3.

Das Dendrogramm beruht auf dem Vergleich von Vollsequenzen der 16S rRNA, kalkuliert nach der Neighbor-Joining Methode. Die angegebenen Werte repräsentieren prozentuale Angaben der Bootstrap-Werte von 500 Wiederholungen. Der Balken im unteren Bereich des Dendrogramms symbolisiert 5 Nukleotidaustausche pro 100 Nukleotide.

3.1.4 Vergleich von MH-Cr 6.3 mit *P. piscicida* und *P. rubra*

Aufgrund der hohen Ähnlichkeit aus der phylogenetischen Analyse von MH-Cr 6.3 zu *P. piscicida* und *P. rubra* wurde ein Vergleich der phenotypischen Merkmale durchgeführt. In Tab. III.11a + b sind alle Eigenschaften gegenübergestellt. Auffällig ist auch hierbei eine sehr hohe Ähnlichkeit der drei Stämme. Unterschiede in der Substratverwertung sind nicht vorhanden. Als alleinige C-Quelle werden keine Zucker, Aminosäuren jedoch gut verwertet. Alle drei Stämme besitzen gleiche Ansprüche an die Mediumszusammensetzung. MB-Agar ist zum Wachstum geeignet, NB-, MPY- und CP-Agar hingegen nicht. Mit dem für MH-Cr 6.3 optimierten Medium (s. Kap. 4.2.4) wird das Wachstum von allen drei Stämmen verbessert (Daten nicht gezeigt). Ein Unterschied ist zwischen MH-Cr 6.3 und *P. rubra* bei Vergleich der Wachstumstemperaturen zu finden. Das Wachstum von MH-Cr 6.3 bei 4°C ist zwar stark verlangsamt, wird jedoch nicht eingestellt. *P. rubra* hingegen zeigt bei 4°C kein Wachstum [Baumann *et al.* 1984]. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen allen drei Stämmen befindet sich in der Art und Anzahl der Farbstoffe. *P. rubra* produziert den roten Farbstoff Prodigiosin [Gauthier *et al.* 1976a], die anderen beiden Stämme produzieren gelbe Pigmente. In dem Zellextrakt von *P. piscicida* ATCC 15057 wurden auf der DC drei verschiedene Farbstoffspots mit Rf: 0,24, 0,16 und 0,02 gefunden. Der Zellextrakt von MH-Cr 6.3 enthält jedoch nur zwei Farbstoffspots (Rf: 0,24 und 0,16). Während der Vergleichskultivierung im Schüttelkolben war bereits zu beobachten, daß die Kulturbrühe von *P. piscicida* intensiver und dunkler gefärbt war als die Kulturbrühe von MH-Cr 6.3.

Tab. III.11a: Phenotypische Merkmale von MH-Cr 6.3, *P. piscicida* und *P. rubra*.

	MH-Cr 6.3	<i>P. piscicida</i> ATCC 15057	<i>P. rubra</i> DSM 6842
Farbstoffbildung	+(gelb/orange) zwei Substanzen	+(gelb/orange) drei Substanzen	+(rot) Prodigiosin ^{1.)}
Polar begeißelt	+	+	+ ^{1.)}
Lyse durch 3 % KOH	+	+	+
Na ⁺ -Bedarf	+	+ ^{3.)}	+ ^{1.)}
Oxidasetest	+	+ ^{3.)}	+ ^{1.)}
Katalasetest	+	+ ^{3.)}	+ ^{1.)}
Wachstum bei:			- ^{2.)}
4°C	+		+ ^{1.)}
37°C			

Tab. III.11b: Phenotypische Merkmale von MH-Cr 6.3, *P. piscicida* und *P. rubra*.

	MH-Cr 6.3	<i>P. piscicida</i> ATCC 15057	<i>P. rubra</i> DSM 6842
Wachstum auf:			
Marine Broth-Agar	+	+	+
Nutrient Broth Agar	-	-	-
MPY-Agar	-	-	-
CP-Agar	-	-	-
Urease	-	-	-
Arginin-Dihydrolase	-	-	-
Indol	-	-	-
H ₂ S Produktion	-	-	-
Voges-Proskauer Reaktion	-	-	-
Substratverwertung:			
D-Glukose	-	-	-
D-Xylose	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-
Laktose	-	-	-
Trehalose	-	-	-
Mannitol	-	-	-
Maltose	-	-	-
Maltotriose	-	-	-
Citrat	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Saccharose	-	-	-
Fruktose	-	-	- ^{2.)}
Glycerol	-	-	- ^{1.)}
β-D-Glukosamide	+	+	+ ^{1.)}
Galaktoside	-	-	- ^{1.)}
Maltoside	+	+	-
Cellobiose	-	-	- ^{1.)}
Phosphat	+	+	-
L-Valin	+	+	-
L-Phenylalanin	+	+	-
L-Glutaminsäure	+	+	-
L-Tryptophan	+	+	-
L-Arginin	+	+	-
L-Isoleucin	+	+	-
Prolin	+	+	+ ^{4.)}
Leucin	+	+	-
Esculin	-	-	-
Antimikrobielles Produkt	+	+	+

1.) Gauthier *et al.* 1976a2.) Baumann *et al.* 19843.) Hansen *et al.* 19654.) Sawabe *et al.* 1998

Aufgrund der hohen Ähnlichkeiten wird der Stamm MH-Cr 6.3 im folgenden mit *Pseudoalteromonas* spec. MH-Cr 6.3 (MH-Cr 6.3) bezeichnet.

3.2 Charakterisierung der antimikrobiellen Substanzen

Erste Anhaltspunkte zur wirksamen Substanz im Zellextrakt lieferte der DC-Overlay-Test. Im Bioautogramm mit *B. megaterium* als Testorganismus konnte die antimikrobielle Wirkung einem unpolaren Spot auf der DC zugeordnet werden, der beim Behandeln mit Methanol/H₂SO₄ durch rot/braun Färbung detektiert wird (Daten nicht gezeigt). Zur Isolierung der wirksamen Substanz wurden 15 l Bakterienkultur aufgearbeitet und der gewonnene Zellextrakt auf einer Kieselgelsäule 2,5 cm × 16 cm, Laufmittel MTBE, Methanol filtriert. Anschließend wurde die im antimikrobiellen Test positive Fraktion über folgende Schichtchromatographieschritte aufgereinigt:

- a) NP-Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufmittel: 1. MTBE; 2. Cyclohexan
- b) NP-Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufmittel: CHCl₃/Methanol/H₂O (65/15/2; v/v/v)
- c) NP-Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufmittel: MTBE

Aus 1,5 g Ausgangsmaterial wurden 91 mg Substanz mit antimikrobieller Wirkung isoliert. Die isolierte Fraktion wurde nach Methylierung mit Trimethylsulfonium-hydroxid (TMSH, 0,2 M in Methanol) mittels GC/MS identifiziert. Die erhaltenen Daten sind in Tab. III.12 zusammengefaßt.

Tab. III.12: GC/MS-Daten der aufgereinigten Fraktion aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3 nach Reaktion mit TMSH.

Im Massenspektrum wurden die positiven Molekulationen [M-H]⁺ der Fettsäuren nachgewiesen. Die Position der Doppelbindung wurde durch Vergleich mit dem zellulärem Fettsäureprofil ermittelt.

m/z Wert	Fettsäure	% Anteil	Struktur
256	C 15:0	1,41	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ COOH
268	C 16:1 ^{Δ9}	39,39	CH ₃ (CH ₂) ₅ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
270	C 16:0	26,75	CH ₃ (CH ₂) ₁₄ COOH
282	C 17:1 ^{Δ9}	5,30	CH ₃ (CH ₂) ₆ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
284	C 17:0	4,44	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ COOH
296	C 18:1 ^{Δ9}	1,89	CH ₃ (CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ COOH
298	C 18:0	5,13	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ COOH

Es handelt sich hierbei um ein Gemisch aus 7 verschiedenen Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 15 bis 18 C-Atomen. Bei dreien handelt es sich um einfach ungesättigte Fettsäuren. Die Hauptkomponenten sind Palmitoleinsäure (40 %) und Palmitinsäure (27 %). Durch Vergleich der GC/MS Daten mit den Ergebnissen aus der Ermittlung des zellulären Fettsäureprofils (s. Tab. III.9) war eine Zuordnung der Position und Anordnung der Doppelbindung möglich.

Um herauszufinden bei welcher der 7 Fettsäuren es sich um die antimikrobielle Substanz handelt, wurden entsprechende Referenzen im Plättchentest mit *B. megaterium* eingesetzt. Tab. III.13 zeigt die Ergebnisse aus dem Plättchentest für drei verschiedene Konzentrationen. Die gesättigten Fettsäuren zeigen keine Wirkung gegen den Testorganismus. Die beiden ungesättigten Fettsäuren cis-9-Hexadecensäure und cis-9-Heptadecensäure zeigen bei 250 µg deutliche Wirkung. Die Wirkung von Ölsäure ist viel schwächer und erst bei ≥ 750 µg zu beobachten. Bei Berücksichtigung der prozentualen Zusammensetzung der aufgereinigten Fraktion ergibt sich für einen Ansatz im Plättchentest, der einen Hemmhofdurchmesser von 11 mm ergibt, folgende Zusammensetzung: 179 µg C16:1; 24,1 µg C17:1; und 8,6 µg C18:1. Somit ist die antimikrobielle Wirkung der Fettsäurefraktion aus MH-Cr 6.3 überwiegend auf das Vorhandensein von cis-Hexadecensäure und cis-9-Heptadecensäure zurück zu führen. Die schwache Wirkung von Ölsäure kommt bei der geringen Konzentration nicht zum Tragen.

Tab. III.13: Hemmhofdurchmesser (mm) ausgewählter Referenzen gegen *B. megaterium* im Plättchentest.

Es wurden jeweils 10 µl Testsubstanz als Ethanollösung auf ein Filterplättchen aufgetragen. Als Blindprobe wurde Ethanol ohne Substanzzusatz eingesetzt.

Substanz	250 µg	500 µg	750 µg
Pentadecansäure (Sigma)	neg.	neg.	neg.
cis-9-Hexadecensäure (Sigma)	9	10	17
Palmitinsäure (Sigma)	neg.	neg.	neg.
cis-9-Heptadecensäure (Sigma)	10	11	21
Margarinsäure	neg.	neg.	neg.
Ölsäure (Fluka)	+/-	+/-	8
Stearinsäure (Sigma)	neg.	neg.	neg.

Die Fettsäurefraktion wird zur Ermittlung des Wirkspektrums in weitere Plättchentests mit verschiedenen Testorganismen eingesetzt. Die aktive Fettsäurefraktion hemmt die beiden grampositiven Testorganismen *B. megaterium* und *S. aureus*, die Species *B. subtilis* wird jedoch nicht gehemmt (Tab. III.14). Von den gramnegativen Bakterien wird *Ps. aeruginosa* durch die Fettsäurefraktion gehemmt, *E. coli* hingegen wird nicht gehemmt. Von den getesteten Pilzen wird lediglich *U. violacea* inhibiert. Außerdem wird das Wachstum der Alge *C. fusca* inhibiert. Der Hemmhofdurchmesser in Abhängigkeit von der Konzentration wird zur Produktdetektion bei den folgenden Kultivierungen genutzt.

Tab. III.14: Hemmhofdurchmesser (mm) der Fettsäurefraktion im Plättchentest.

Es wurden jeweils 10 µl der Fettsäurefraktion als Ethanollösung auf ein Filterplättchen gegeben. Als Blindprobe wurde Ethanol ohne Substanz eingesetzt.

Testorganismus	100 µg	200 µg	300 µg
<i>B. megaterium</i>	8	9	10
<i>B. subtilis</i>	neg.	neg.	neg.
<i>S. aureus</i>	6	9	12
<i>Ps. aeruginosa</i>	7	10	13
<i>E. coli</i>	neg.	neg.	neg.
<i>U. violacea</i>	7	10	12
<i>U. maydis</i>	neg.	neg.	neg.
<i>F. oxysporum</i>	neg.	neg.	neg.
<i>E. repens</i>	neg.	neg.	neg.
<i>M. microspora</i>	neg.	neg.	neg.
<i>C. cucumerinum</i>	neg.	neg.	neg.
<i>C. fusca</i>	9,5	11	12

Von der aufgereinigten und identifizierten Fettsäurefraktion wird zur Ermittlung der quantitativen Wirkung der IC₅₀-Wert mittels Röhrchentest bestimmt (Tab. III.15). Die Wirkstoffkonzentration bei 50 %iger Wachstumsinhibierung beträgt für *Ps. aeruginosa* 20 µg ml⁻¹ und für die grampositiven Mikroorganismen *S. aureus* 30 µg ml⁻¹ und für *B. megaterium* 165 µg ml⁻¹. Die MHK-Werte liegen für *Ps. aeruginosa* und *S. aureus* bei 512 µg ml⁻¹ und für *B. megaterium* und *E. coli* bei > 512 µg ml⁻¹.

Tab. III.15: Quantitative Bestimmung der antimikrobiellen Wirkung.
Die aufgereinigte Fettsäurefraktion von MH-Cr 6.3 wurde im Röhrchentest mit *Ps. aeruginosa*, *E. coli*, *B. megaterium* und *S. aureus* bei 30°C in Nutrient Broth-Medium eingesetzt.

Testorganismus	IC ₅₀ [µg ml ⁻¹]	MHK [µg ml ⁻¹]
<i>Ps. aeruginosa</i>	20	512
<i>E. coli</i>	> 512	> 512
<i>B. megaterium</i>	165	> 512
<i>S. aureus</i>	30	512

Neben der Ermittlung der antimikrobiellen Wirkung, wurde weiterhin die Toxizität der Fettsäurefraktion mittels Biolumineszenztest ermittelt. In Abb. III.6 ist ein Bioautogramm dargestellt. Die aufgereinigte Fraktion (linke Bahn) zeigt toxische Wirkung im Biolumineszenztest. Die Toxizität wurde anhand eines Plättchentests quantifiziert (Tab. III.16). Der ermittelte Hemmhofdurchmesser ist vergleichbar mit der antimikrobiellen Wirkung der Substanz bei den anderen Testorganismen.

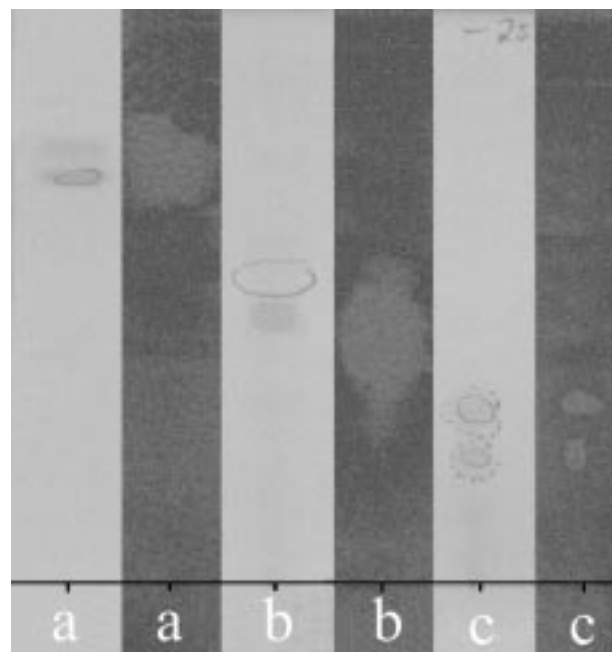


Abb. III.6: Reduktion der Biolumineszenz durch intrazelluläre Substanzen von MH-Cr 6.3. Digitalisierte und konvertierte Dünnschichtchromatogramme des Biolumineszenztests im Vergleich mit der konventionellen DC.
a) antimikrobielle Fettsäurefraktion, b) β -Hydroxyfettsäuren, c) Pigmente
Kieselgel F₂₅₄; Laufmittel CHCl₃/Methanol/H₂O (65+15+2); Detektion: helle DC: Methanol/H₂SO₄; dunkle DC: *Vibrio fischeri* – Suspension

Tab. III.16: Hemmhofdurchmesser [mm] der Fettsäurefraktion im Biolumineszenztest.
Biolumineszenztest mit *Vibrio fischeri* wurde als Plättchentest durchgeführt.

	125 µg	250 µg	500 µg
bioaktive Fettsäurefraktion	8,5	11	12

Die aufgereinigte Fettsäurefraktion wurde für die externen Aktivitätstests zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse sind in Tab. III.17 zusammengestellt. Im zytotoxischen Test mit *A. salina* zeigten 500 µg der Fettsäurefraktion nach 24 h eine schwache und nach 48 h sogar eine deutliche Wirkung.

Der Test auf antitumorale Aktivitäten, der durch die Bestimmung von Proteinkinaseaktivitäten erfolgte, zeigt bei drei verschiedenen Enzymen mit 10 µg ml⁻¹ deutliche Wirkung.

Tab. III.17: Übersicht weiterer biologischer Aktivitäten aus extern durchgeführten Tests.

Test	Wirkung
zytotoxisch (L 5178 Y Zellen)	≥ 10 µg ml ⁻¹
neuroprotektiv	≥ 300 µg ml ⁻¹
zytotoxisch (<i>A. salina</i>)	nach 24 h Hemmung/kein voller Effekt nach 48 h keine Bewegung/voller Effekt
nematozid (<i>C. elegans</i>)	≥ 500 µg ml ⁻¹
antiviral	neg.
antitumoral:	10 µg ml ⁻¹
CDK4	-36 %
CDK2	-69 %
PDGF-Rb-TK	-29 %
EGF-R-TK	-82 %
ErbB2-TK	-14 %
FGF-R1-TK	-32 %
IGF-1-R-TK	-16 %
Ins-R-TK	-40 %
PKC-g	42 %
PKC-e	-63 %
JAK2	-34 %

+ Aktivierung

- Inhibierung

3.3 Charakterisierung weiterer Metabolite des Produktspektrums

Neben der biologisch aktiven Fettsäurefraktion gibt es noch weitere Metabolite im Zellextrakt von MH-Cr 6.3. Auffällig sind zwei UV 366 nm aktive gelbe polare Pigmente (Pigment 1 und Pigment 2). Etwa auf gleicher Höhe befinden sich auf der DC zwei Spots, die nach Reaktion mit α -Naphthol lila/grau erscheinen. Diesen Flecken folgen zwei etwas unpolare Metabolite, die mit α -Naphthol grau gefärbt werden. Neben mehreren schwachen UV aktiven Spots befindet sich ein weiterer etwas größerer Fleck zwischen der unpolaren Fettsäurefraktion und dem grauen α -Naphthol-Spot (Abb. III.7). Die zugehörigen Rf-Werte sind in Tab. III.18 aufgeführt.

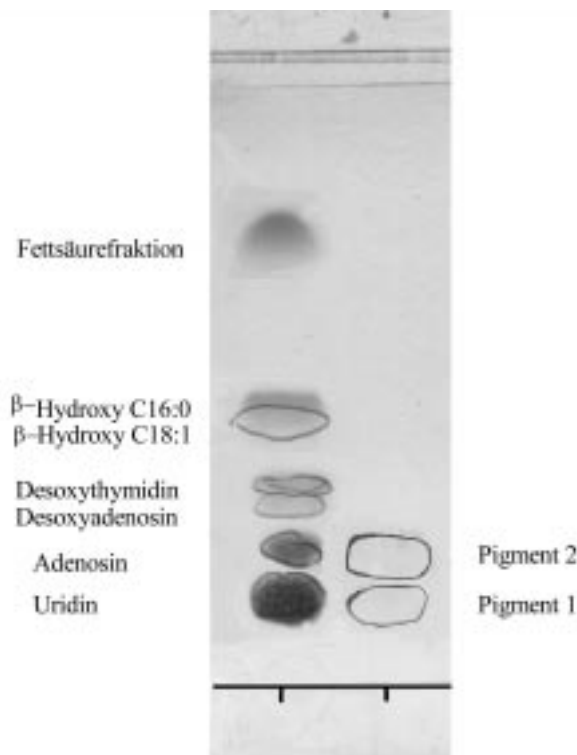


Abb. III.7: Produktspektrum des Zellextraktes von MH-Cr 6.3.
Kieselgel 60 F₂₅₄, Laufmittel: CHCl₃/Methanol/H₂O; (65/15/2; v/v/v);
Detektion: α -Naphthol

Tab. III.18: Rf-Werte der Zellextraktmetabolite von MH-Cr 6.3.
Kieselgel 60 F₂₅₄; Laufmittel: CHCl₃/Methanol/H₂O; (65/15/2; v/v/v).

Matabolit	Rf-Wert
Uridin	0,15
Adenosin	0,23
Farbstoff 1	0,16
Farbstoff 2	0,24
2-Desoxyadenosin	0,28
2-Desoxythymidin	0,31
β- OH-C16:1	0,45
β- OH-C18:1	0,45
aktive Fettsäurefraktion	0,71

Die weiteren Metabolite aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3 wurden chromatographisch aufgetrennt. Zur Strukturaufklärung wurden Massen-, als auch ¹H- und ¹³C-Spektren angefertigt. Es werden nacheinander von allen isolierten Verbindungen die NMR-Daten, Massenzahlen und die daraus abgeleiteten Strukturen aufgeführt.

a) Uridin

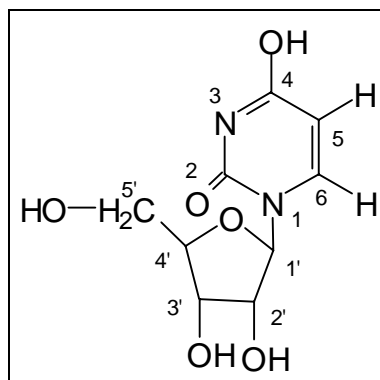


Abb. III.8: Molekülstruktur von Uridin.
 Summenformel: $C_9H_{12}N_2O_6$
 Molekulargewicht: 244 g mol^{-1}

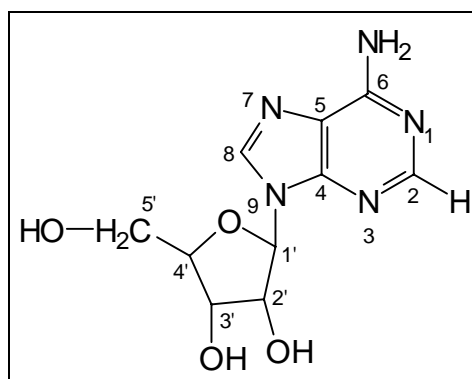
Tab. III.19: NMR-Daten von Uridin aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3.

	chemische Verschiebung	Kopplung		chemische Verschiebung	Kopplung
C2	151,8	s			
C4	165,4	s			
C5	102,5	d	H5	5,7	d J = 8,1 Hz
C6	142,0	d	H6	8,0	d J = 8,1 Hz
C1'	90,4	d	H1'	5,9	d J = 3,9 Hz
C2'	75,2	d	H2'	4,2	dd
C3'	72,1	d	H3'	4,2	dd
C4'	85,7	d	H4'	4,1	dd J = 6,7 Hz J = 2,6 Hz
C5'	63,1	t	H5A'	3,9	dd J = 12,3 Hz J = 2,6 Hz
			H5B'	3,8	dd J = 12,4 Hz J = 3,0 Hz

MS (ESI -Q1MS)

$m/z = 243$ ($[M-H]^-$)

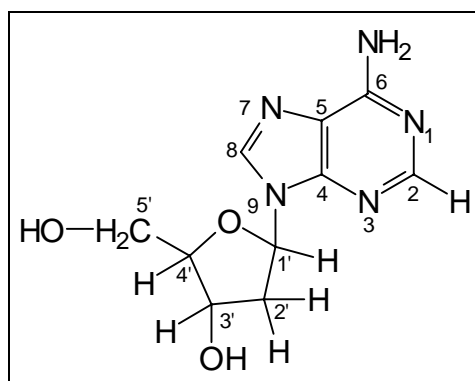
b) Adenosin

**Abb. III.9:** Molekülstruktur von Adenosin.Summenformel: $C_{10}H_{13}N_5O_4$ Molekulargewicht: 267 g mol^{-1} **Tab. III.20:** NMR-Daten von Adenosin aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3.

	chemische Verschiebung	Kopplung		chemische Verschiebung	Kopplung
C2	152,8	d	H2	8,2	
C4	149,1	s			
C5	120,7	s			
C6	156,9	s			
C8	141,4	d	H8	8,2	
C1'	91,2	d	H1'	5,9	d J = 6,6 Hz
C2'	74,8	d	H2'	4,8	dd J = 6,5 Hz J = 5,2 Hz
C3'	73,0	d	H3'	4,4	dd J = 5,1 Hz J = 2,1 Hz
C4'	87,8	d	H4'	4,3	dd J = 4,0 Hz J = 2,0 Hz
C5'	61,6	t	H5A'	3,9	dd J = 12,7 Hz J = 2,1 Hz
			H5B'	3,8	dd J = 12,6 Hz J = 2,4 Hz

MS (ESI +Q1MS) $m/z = 268 \text{ ([M-H]}^+)$

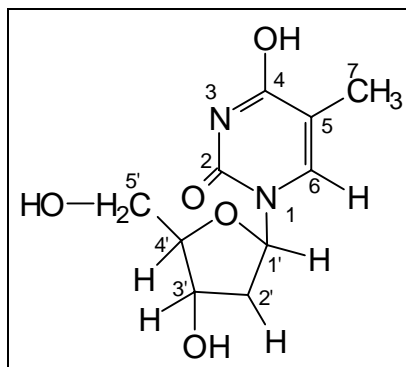
c) Desoxyadenosin

**Abb. III.10:** Molekülstruktur von Desoxyadenosin.Summenformel: $C_{10}H_{13}N_5O_3$ Molekulargewicht: 251 g mol^{-1} **Tab. III.21:** NMR-Daten von Desoxyadenosin aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3.

	chemische Verschiebung	Kopplung		chemische Verschiebung	Kopplung
C2	153,0	d	H2	8,2	
C4	149,3	s			
C5	120,6	s			
C6	156,9	s			
C8	141,1	d	H8	8,2	
C1'	87,2	d	H1'	6,4	m
C2'	41,4	t	H2A'	2,9	m
			H2B'	2,5	m
C3'	72,8	d	H3'	4,6	m
C4'	89,6	d	H4'	4,2	m
C5'	63,4	t	H5A'	3,9	dd J = 30 Hz J = 2,5 Hz
			H5B'	3,8	dd J = 14 Hz J = 3 Hz

MS (FAB pos. und neg.) $m/z = 252$ ($[M-H]^+$) $m/z = 134$ ($[C_5H_4N_5]^-$) $m/z = 136$ ($[C_5H_5N_5-H]^+$)

d) Desoxythymidin

**Abb. III.11:** Molekülstruktur von Desoxythymidin.Summenformel: $C_{10}H_{14}N_2O_5$ Molekulargewicht: 242 g mol^{-1} **Tab. III.22:** NMR-Daten von Desoxythymidin aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3.

	chemische Verschiebung	Kopplung		chemische Verschiebung	Kopplung
C6	166,0	s	H6	7,78	q
C2	151,9	s			
C5	137,6	d			
C4	111,4	s			
C7	12,5	q	H7	1,9	d, J = 1,1 Hz
C1'	85,8	d	H1'	6,3	t
C2'	41,1	t	H2A'	2,3	J = 6,7 Hz
			H2B'	2,3	m
C3'	71,6	d	H3'	4,4	m
C4'	88,2	d	H4'	4,0	m
C5'	62,4	t	H5A'	3,8	m
			H5B'	3,8	m

MS (EI) $m/z = 241 ([M-H]^-)$ **MS (FAB neg.)** $m/z = 125 ([C_5H_5N_2O_2]^-)$

e) β -Hydroxyfettsäuren

1.) β -OH-C16:0 ($C_{16}H_{32}O_3$); $M=272 \text{ g mol}^{-1}$

2.) β -OH-C18:1 ($C_{18}H_{34}O_3$); $M=298 \text{ g mol}^{-1}$

Tab. III.23: NMR-Daten der β -Hydroxyfettsäuren aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3.

	chemische Verschiebung	Kopplung		chemische Verschiebung	Kopplung
C1	176,4 – 177,1	s			
C2	130,2-128,7	m	H2A	2,6	m
			H2B	2,5	m
C3	68,1	d	H3	4,0	m
C4	65,4 – 63,4	t	H4	1,5	m
C5n-1	41,1 – 22,7	t	H5	1,1 – 1,4	m
C5n	14,2	q	H6	0,9	m

GC/MS (Methylester)

$m/z : 286 \text{ g mol}^{-1}$

$m/z: 236 ([M-18-32]^+)$

$m/z : 103 ([C_5H_{10}O_2]^+)$

$m/z : 312 \text{ g mol}^{-1}$

$m/z: 294 ([M-18]^+)$

$m/z: 262 ([M-18-32]^+)$

$m/z: 103 ([C_5H_{10}O_2]^+)$

Alle aufgereinigten Substanzen wurden auf antimikrobielle und toxische Aktivitäten untersucht. Die Nukleoside und Desoxynukleoside zeigen weder bei den antimikrobiellen Tests noch bei dem Biolumineszenztest Aktivitäten. Das Gemisch aus β -Hydroxyfettsäuren zeigt keine antimikrobielle Wirkung. Im Biolumineszenztest wird jedoch die Leuchtkraft des Testorganismus reduziert (Abb. III.6). 100 μg Substanz erzeugen einen Hemmhof von 10 mm.

f) Untersuchungen der Pigmente

Die Isolierung der Farbstoffe war mit den durchgeführten chromatographischen Trennverfahren (sowohl mit NP- als auch mit RP-Material) nicht möglich, da die Pigmente stark an einer weißen polaren Substanz adsorbieren. Anhand der aufgenommenen Spektren könnte man annehmen, daß es sich bei dieser Substanz um Protein handelt. Die Fällung der Substanz aus wässriger oder organischer Lösung war mit keinem getesteten Lösungsmittel/Wasser möglich. In einer früheren Arbeit zur Farbstoffidentifizierung des Stammes *Pseudoalteromonas piscicida* ATCC 15251 wurden die IR-Spektren verschiedener bicyclischer Verbindungen mit dem Misch-IR-Spektrum des nur ungenügend aufgereinigten Pigments verglichen und Pipterin als Grundgerüst vorgeschlagen [Hansen *et al.* 1965]. Das IR-Spektrum (Abb. III.12) des Farbstoffgemisches von MH-Cr 6.3 aus *C. rosea* kann diesen Strukturvorschlag nicht bestätigen. Da es sich hier, wie die NMR- und MS-Spektren zeigen, auch wie bei den von Hansen beobachteten Verunreinigungen um Protein handeln könnte, ist eine Unterscheidung zwischen Pipteridinbanden und den im Spektrum dominierenden Proteinbanden schwierig. Bei 3423 cm^{-1} ist deutlich der Peak einer freien OH-Gruppe erkennbar. Die Peaks bei 2850 bis 2960 cm^{-1} könnten die N-H-Valenzschwingungen der Peptidbindungen sein.

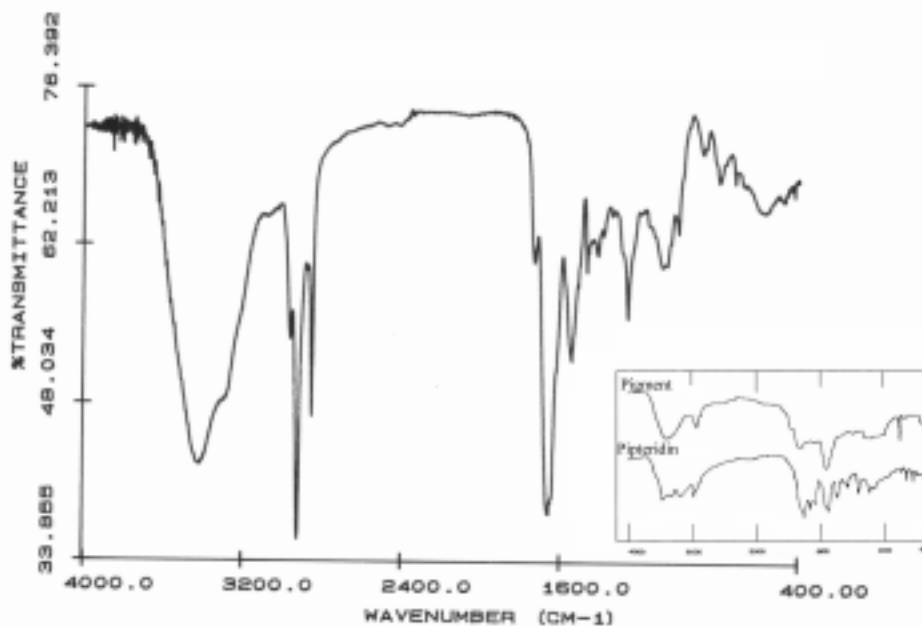


Abb. III.12: IR-Spektrum des Farbstoffgemisches aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3. IR-Vergleichsspektrum von *P. piscicida* ATCC 15251 Farbstoff und Pipteridin [Hansen *et al.* 1965].

Der Farbstoff ist im neutralen Bereich gelb, im sauren Bereich sind keine Farbveränderungen zu beobachten. Bei Erhöhung des pH-Wertes auf pH 11 geht die gelbe Farbe in ein dunkles orange über.

Von dem aufgereinigten Substanz-Farbstoffgemisch wurde ein UV-Spektrum aufgenommen (Abb. III.13). Das Maximum einer wässrigen Lösung liegt bei neutralem und basischem pH-Wert bei 420 nm. Die zu beobachtende Farbveränderung von gelb zu orange bei pH 11 ist im UV-Spektrum an dieser Stelle nicht zu erkennen. Die Veränderung des pH-Wertes zum sauren Bereich führt im UV-Spektrum zu einem hypsochromen Shift von 60 nm. Das Maximum des Farbstoffes in CHCl_3 /Methanol (1+1) liegt bei 379 nm.

Die isolierte Farbstofffraktion zeigt keine antimikrobiellen Wirkungen gegenüber den Testorganismen. Im Biolumineszenztest zeigen 100 μg der aufgereinigten Fraktion jedoch einen Hemmhof von 10 mm (Abb. III.6).

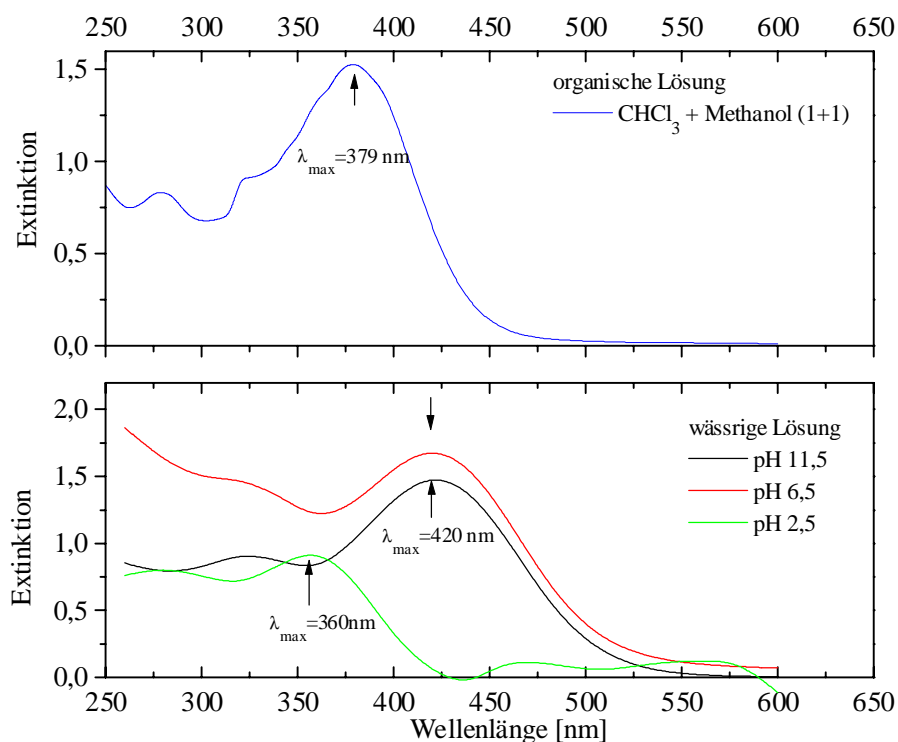


Abb. III.13: UV-Spektrum des Pigments von MH-Cr 6.3.

4. Charakterisierung des Wachstumsverhalten von *Pseudoalteromonas spec.* MH-Cr 6.3

4.1 Kultivierung in Marine Broth-Medium

Der Stamm *Pseudoalteromonas spec.* MH-Cr 6.3 wurde im Rahmen des Screenings nach biologisch aktiven Substanzen von Marine Broth-Agar isoliert. Dieses Medium enthält als Substratquelle lediglich 0,1 % Hefeextrakt und 0,5 % Pepton. Durch den hohen Anteil an Kochsalz (2 %) ist dieses Medium insbesondere zur Kultivierung von marinen Bakterien geeignet.

4.1.1 Kultivierung im Schüttelkolben

Das Wachstum von MH-Cr 6.3 in MB-Medium verläuft im Schüttelkolben wie in Abb. III.13 dargestellt.

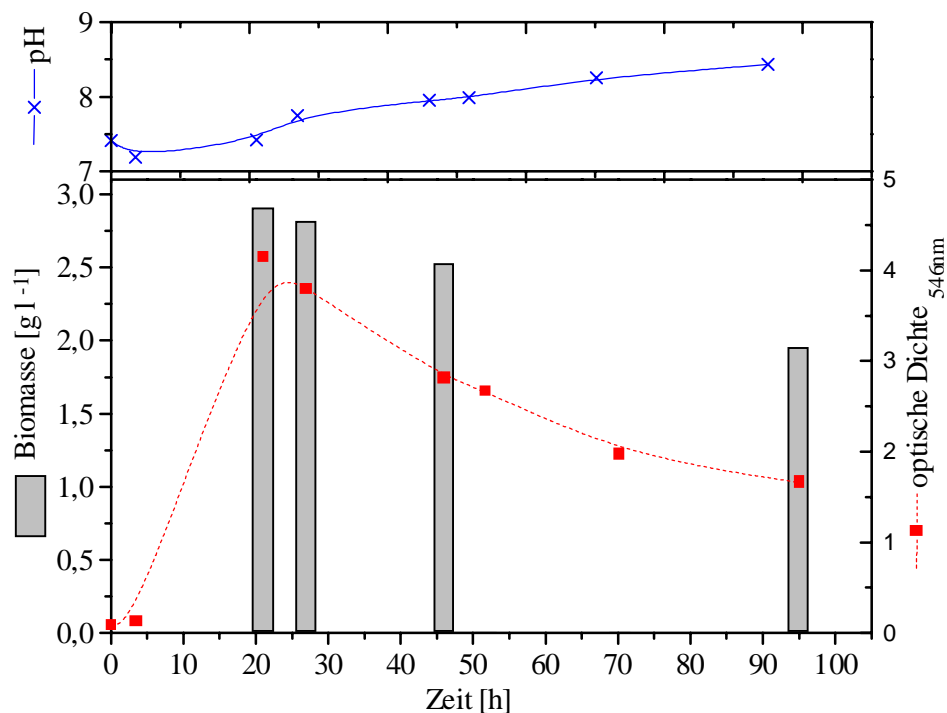


Abb. III.13: Wachstumsverhalten von MH-Cr 6.3 im Schüttelkolben.
Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; MB-Medium; 27°C; 100 Upm

Der Organismus wächst innerhalb von 22 h bis zu einer maximalen optischen Dichte von 4,2. Die aus dem Verlauf der optischen Dichte berechnete maximale Wachstumsrate beträgt nach 22 h $0,19 \text{ h}^{-1}$. Anschließend geht der Organismus in die Absterbephase über. Der pH-Wert steigt im Verlauf der Kultivierung langsam auf einen Wert von 8,4. Die BTM beträgt am Ende der exponentiellen Wachstumsphase $2,91 \text{ g l}^{-1}$. Aus den Zellen wurden $0,08 \text{ g l}^{-1}$ Rohextrakt gewonnen mit 12 mg l^{-1} C16:1 und $1,7 \text{ mg l}^{-1}$ C17:1. Der Rohextrakt zeigt im Plättchentest mit *B. megaterium* bei einer Verdünnung von 1:25 einen Hemmhof von 8 mm.

4.1.2 Kultivierung im 50 l Bioreaktor

Aufgrund der geringen Produktausbeuten bei Schüttelkolbenkultivierungen wurde ein Scale up im 50 l Bioreaktor durchgeführt. Eine Bioreaktorkultivierung bietet den Vorteil, daß verschiedene Parameter wie z.B. pH-Wert, Begasungsrate und Rührung geregelt werden können. Außerdem werden online-Messungen von der Sauerstoffkonzentration im Medium sowie Sauerstoff- und Kohlendioxidkonzentrationen im Abgas durchgeführt. Um das Wachstum von MH-Cr 6.3 charakterisieren zu können und mehr Produkt zur Verfügung zu stellen, wurde eine Batch-Kultivierung im 50 l Bioreaktor durchgeführt. In Abb. III.14 ist der Verlauf der Kultivierung eines 30 l Ansatzes mit MB-Medium dargestellt.

Ohne Verzögerungsphase geht das Wachstum von MH-Cr 6.3 in die exponentielle Wachstumsphase über und erreicht bereits nach 3 h eine Wachstumsrate μ_{\max} von $0,21 \text{ h}^{-1}$. Nach 14 h erreicht die Biomassekonzentration das Maximum von $3,4 \text{ g l}^{-1}$ und bleibt anschließend konstant. Während des exponentiellen Wachstums verbraucht der Organismus verstärkt Sauerstoff. Der maximale Sauerstoffverbrauch ist nach 3,33 h erreicht, bleibt bis 8,5 h konstant und sinkt anschließend wieder ab. Einhergehend mit einem Anstieg der Sauerstoffaufnahme ist die Bildung von CO_2 zu beobachten. Während des Wachstums wird von den Zellen NH_4^+ ausgeschleust, das beim Abbau von Aminosäuren, die auch als C-Quelle verwertet werden, frei wird. Bereits nach 10 h sind fast alle im Medium verfügbaren Aminosäuren vollständig verbraucht (Abb. III.15).

Die Phosphatkonzentration sinkt von $13,5 \text{ mg l}^{-1}$ innerhalb von 2 h auf unter 1 mg l^{-1} und steigt nach 13 h aufgrund der Zellyse wieder bis zu einer Konzentration von 7 mg l^{-1} an (Daten nicht gezeigt). Die Zellproteinkonzentration zeigt über den Kultivierungszeitraum den

gleichen Kurvenverlauf wie die Biomassekonzentration, beträgt jedoch unabhängig vom Zellaufschlußverfahren nur 20 % der BTM (Daten nicht gezeigt).

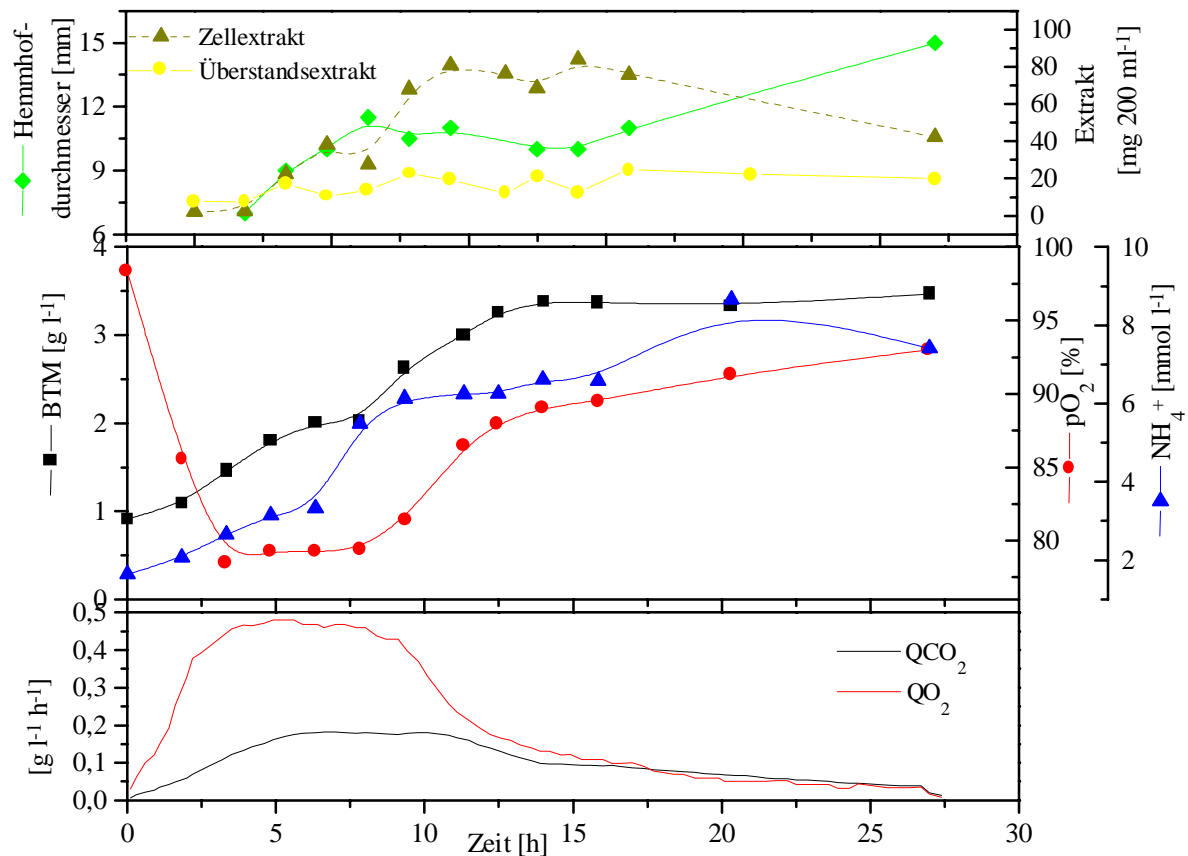


Abb. III.14: Batch-Kultivierung im Bioreaktor mit MH-Cr 6.3.

Bedingungen: 50 l Bioreaktor; 30 l MB-Medium; 520 Upm; 27°C; pH $7,6 \pm 0,2$; 0,1 v/vm; 10 % Inokulum

Sowohl die Wachstumskurve als auch die pO_2 und NH_4^+ -Kurve zeigen zwei verschiedene Wachstumsphasen, was auf eine Diauxie hinweist. Anhand der Aminosäurekonzentrationen ist erkennbar, daß am Ende der ersten Phase (bis 8 h) die Aminosäuren Arg, Tyr, Trp, Phe und Asn vollständig verbraucht sind.

Das Produkt wird während der Kultivierung bereits in der exponentiellen Phase gebildet. Nach 14 h wurden $0,4 \text{ g l}^{-1}$ Zellextrakt produziert. Die Konzentrationen der antimikrobiellen Fettsäuren betragen zu diesem Zeitpunkt 51 mg l^{-1} (C16:1) und 7 mg l^{-1} (C17:1). Bei einer Verdünnung von 1:50 ergibt sich ein Hemmhofdurchmesser von 11 mm. Im Vergleich zu der Schüttelkolbenkultivierung ist die Menge der wirksamen Fraktion um einen Faktor von etwa 4,1 gestiegen.

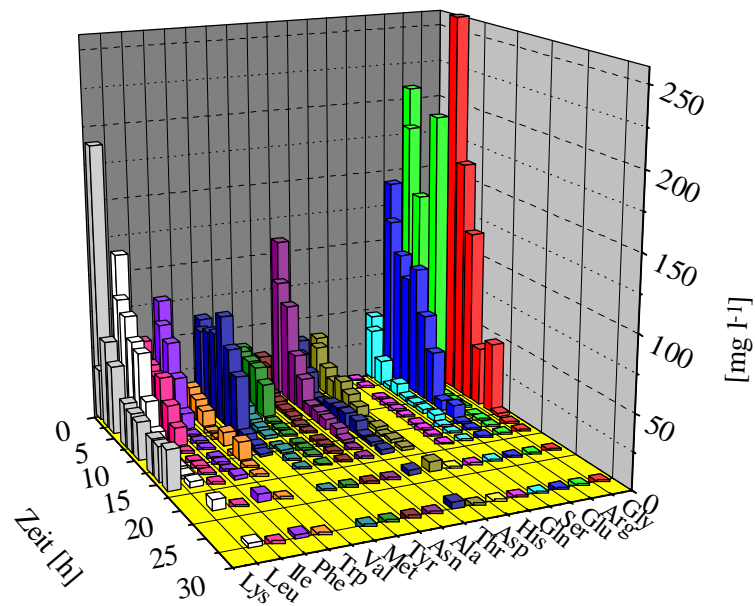


Abb. III.15: Aminosäurekonzentrationen im Verlauf einer Batch-Kultivierung.

Aus Kulturüberständen wurden mittels HPLC die Aminosäurekonzentrationen für eine Batch-Kultivierung mit MH-Cr 6.3 bestimmt.

Bedingungen: 50 l Reaktor; 30 l MB-Medium; 520 Upm; 27°C; pH 7,6 ± 0,2; 0,1 v/vm

4.2 Optimierung des Wachstums von MH-Cr 6.3

Für MH-Cr 6.3 sollte das Wachstum dahingehend optimiert werden, daß eine hohe Biomassekonzentration in kurzer Kultivierungszeit produziert wird. Aufgrund von Beobachtungen in vorangegangenen Untersuchungen wurde festgestellt, daß die Produktion der antimikrobiellen Fettsäuren mit der Biomasseproduktion gekoppelt ist. Daher wird diese als Optimierungsparameter verwendet. Dieses beinhaltet die Entwicklung eines Mediums mit definierter Substratkonzentration. Das bisher verwendete Medium erwies sich grundsätzlich als geeignet und wird als Ausgangspunkt für Optimierungsversuche verwendet. Neben der Ermittlung des Substratspektrums stellen die Salzkonzentration, die Temperatur und die Sauerstoffversorgung Parameter dar, die insbesondere bei marinen Bakterien im Unterschied

zu terrestrischen bisher wenig untersucht sind, das Wachstum und die Biomasseproduktion jedoch beeinflussen.

4.2.1 Abhängigkeit des Wachstums von der NaCl-Konzentration

Da das Wachstum der Gattung *Pseudoalteromonas*, die als typisch marine Bakterien bekannt sind, von der NaCl-Konzentration im Medium abhängig ist [Gauthier & Breitmayer 1992, Baumann *et al.* 1984], sollte diese Abhängigkeit auch für das isolierte Bakterium überprüft werden. Bei einer anderen Gattung, einem marinen Streptomycceten, wurde sogar eine Steigerung der Biomasse um 33 % und ein Anstieg der antimikrobiellen Aktivität bei Zusatz von NaCl beobachtet [Bernan *et al.* 1994].

Der Einfluß der Salzkonzentration, insbesondere der NaCl-Konzentration, auf das Wachstum von MH-Cr 6.3 wurde zum einen durch Verdünnung von MB-Medium bei Zusatz von Hefeextrakt und Pepton als Nährstoffquelle und zum anderen durch Zusatz von NaCl zu MB-Medium untersucht.

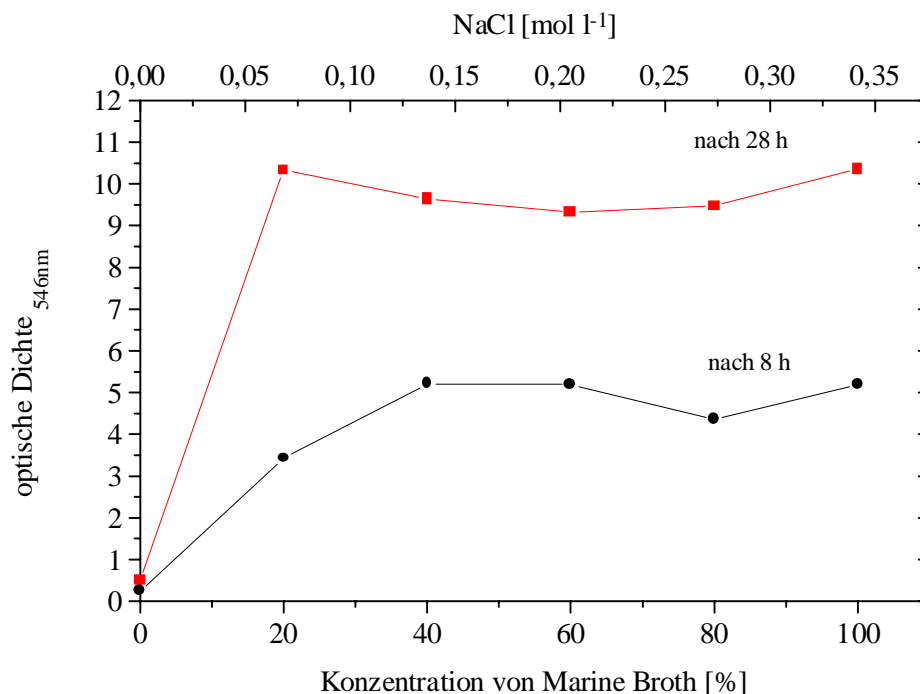


Abb. III.16: Wachstumsverhalten von MH-Cr 6.3 bei verschiedenen MB-Konzentrationen.
Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; MB-Medium; 30 g l⁻¹ Hefeextrakt und 5 g l⁻¹ Pepton; 27°C; 100 Upm

Das Wachstum wird in der exponentiellen Phase (8 h) bei Reduzierung der Salzkonzentration bis $0,14 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl nicht beeinflusst, bei niedrigeren Konzentrationen tritt jedoch eine Wachstumsverzögerung ein. In der stationären Phase (28 h) ist bei $0,07 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl noch kein Unterschied zu beobachten, ohne Zusatz von MB-Medium ist jedoch kein Wachstum möglich. Der Salztoleranzbereich einer 28 h alten Kultur erstreckt sich somit von $0,07 - 0,333 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl (20 % bis 100 % MB) (Abb. III.16). Der Zusatz von NaCl zeigt, daß sich der Toleranzbereich für eine 30 h alte Kultur bis etwa 1 mol l^{-1} erstreckt. Bei höheren Konzentrationen wird das Wachstum inhibiert. In der exponentiellen Phase wird das Wachstum mit steigender NaCl-Konzentration verzögert (Abb. III.17). Da die NaCl-Konzentration in Marine Broth im mittleren Toleranzbereich liegt und auch in der exponentiellen Phase bei dieser Konzentration keine Verzögerung zu beobachten ist, wird die Konzentration von $0,333 \text{ mol l}^{-1}$ NaCl für weitere Optimierungsversuche beibehalten.

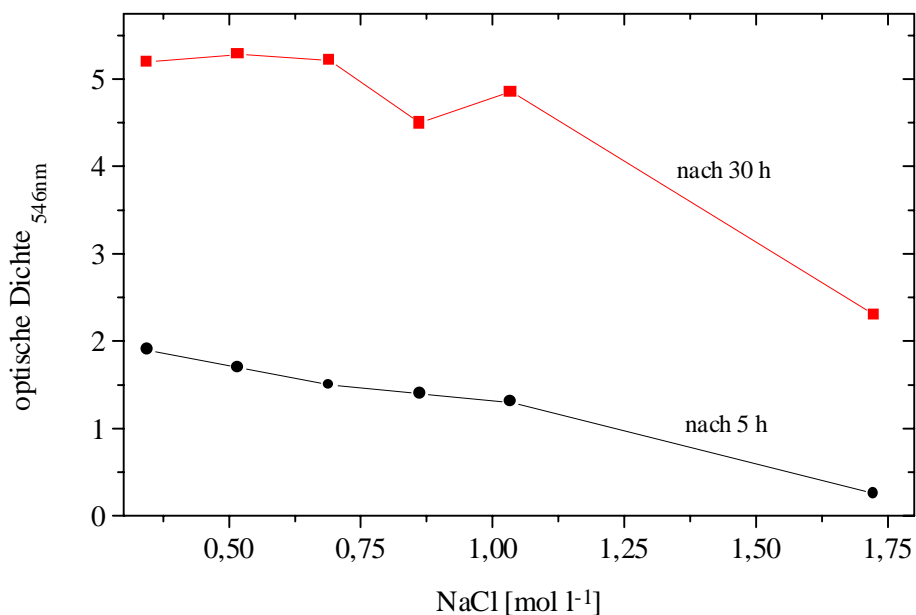


Abb. III.17: Wachstumsverhalten von MH-Cr 6.3 bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen.
Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; MB-Medium; 27°C; 100 Upm

4.2.2 Einfluß verschiedener C-Quellen auf das Wachstum

Um die geeignete zusätzliche Kohlenstoff- und Energiequelle für optimales Wachstum zu finden, wurden 40 % MB-Medium verschiedene C-Quellen in einer Konzentration von 0,3 % zugesetzt. Die Vorkultur wurde auf reinem MB-Medium herangezogen. In Tab. III.24 ist eine Übersicht der Biomassekonzentrationen der verschiedenen Ansätze aufgeführt.

Tab. III.23: Verwertung verschiedener C-Quellen durch MH-Cr 6.3.
Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; 40 % MB; 27°C; 100 Upm; 52 h;
 Anfangs-pH: 7,6

Ansatz	Wachstum	BTM [g/l]	End-pH	Farbstoff
3 g l ⁻¹ Glukose	++	2,62	7,20	++
3 g l ⁻¹ Saccharose	++	2,31	7,80	+++
3 g l ⁻¹ Fruktose	++	1,58	7,75	++
3 g l ⁻¹ D,L Phe	++	1,56	8,41	++
3 g l ⁻¹ Stärke	++	1,53	8,04	++
3 g l ⁻¹ Asn	++	1,32	8,64	++
3 g l ⁻¹ Arg	++	1,17	8,75	++
3 g l ⁻¹ Laktose	+	0,97	8,56	+
40 % MB	+	0,91	8,54	++
3 g l ⁻¹ Lys	+	0,90	8,47	++
3 g l ⁻¹ D,L Trp	+/-	0,89	8,54	++
3 g l ⁻¹ Mannitol	+/-	0,85	8,69	+
3 ml l ⁻¹ Glycerin	+/-	0,83	8,69	+
3 g l ⁻¹ Xylose	+/-	0,78	8,66	+
3 g l ⁻¹ Sorbose	+/-	0,75	8,62	+
3 g l ⁻¹ Ribose	+/-	0,73	8,55	+
3 g l ⁻¹ Cholesterin	-	(1,74 =Restsubstrat)	8,70	+
3 ml l ⁻¹ Ölsäure	-	n.b.	n.b.	-

++ stark, + mittel, +/- schwach, - gar nicht

n.b. = nicht bestimmt

Der Zusatz von Ölsäure wirkt toxisch auf MH-Cr 6.3. Die Substrate Cholesterin, Ribose, Sorbose, Xylose, Glycerin und Mannitol haben ebenfalls einen wachstumsinhibierenden Effekt auf die Zellen. Der Zusatz von Laktose, Lysin und Tryptophan hat keinen Einfluß auf das Wachstum von MH-Cr 6.3. Eine Verbesserung des Wachstums und der Biomasseproduktion wird durch die Aminosäuren Arginin, Asparagin, Phenylalanin und die Zucker Stärke, Fruktose, Saccharose und insbesondere durch Glukose erreicht. Der Zusatz von 0,3 % Glukose führt, im Gegensatz zu den in Tab. III.11b dargestellten Ergebnissen (Glukose als alleinige C-Quelle), in 40 % igem MB-Medium zu einer Steigerung der BTM um einen Faktor von 2,9. Bei Zusatz der verschiedenen Substrate wird keine Veränderung des Produktspektrums beobachtet. Die Produktion des gelben Farbstoffs ist bei Zusatz von Saccharose am stärksten zu beobachten.

4.2.3 Einfluß verschiedener N-Quellen auf das Wachstum

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener N-Quellen auf das Wachstum von MH-Cr 6.3 wurden 20 % MB-Medium mit 1 % Glukose als Ausgangsmedium verwendet. Die Vorkultur wurde in reinem MB-Medium herangezogen. Bei Einsatz von Harnstoff als N-Quelle wird, wie aus Abb. III.18 hervorgeht, das Wachstum vollständig gehemmt. Die beiden Stickstoffverbindungen NH_4Cl und NaNO_3 werden nicht als N-Quelle verwertet. Die Nitrat-Anfangskonzentration bleibt bis zum Ende der Kultivierung konstant (Daten nicht gezeigt). Die NH_4^+ -Konzentration im Ansatz mit NH_4Cl bleibt bis zur 60. Kultivierungsstunde konstant und sinkt bei steigendem pH-Wert in der Absterbephase um 50 %. Bei Zusatz der basischen Aminosäure Asparagin als N-Quelle ist eine Wachstumssteigerung zu beobachten. Ein Vergleich der extrazellulären Ammoniumkonzentrationen beim Versuch mit reinem MB-Medium und beim Zusatz von Asparagin zeigt, daß die von Asparagin zur Verfügung gestellten N-Atome nur zu 2,95 % in Form von NH_4^+ freigesetzt werden (Abb. III.19). Die verbleibenden 97,05 % werden zum Aufbau der Biomasse verwendet.

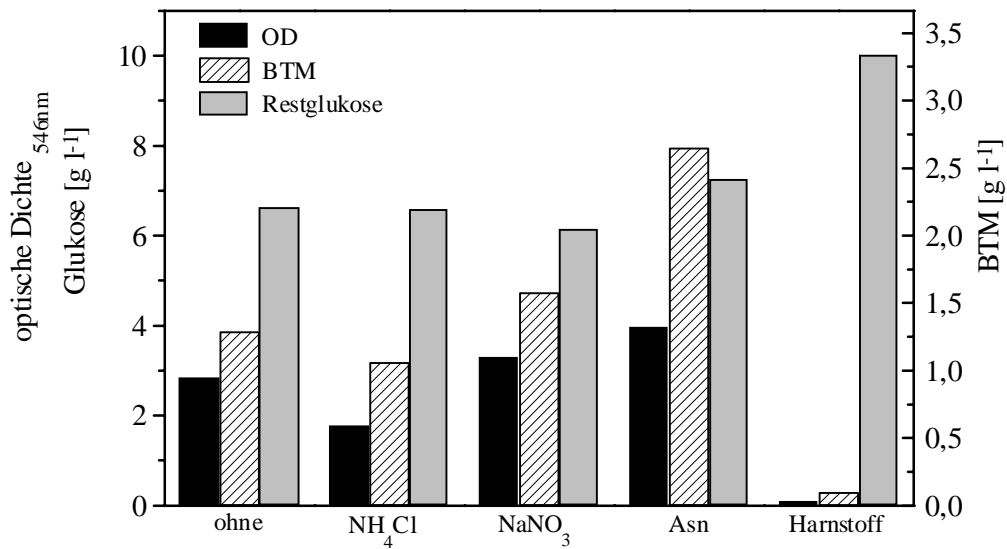


Abb. III.18: Einfluß verschiedener N-Quellen auf das Wachstum von MH-Cr 6.3.

Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; 20 % MB; 1 % Glukose; (Verhältnis: C:N, 5:1) 27°C; 100 Upm; 52 h

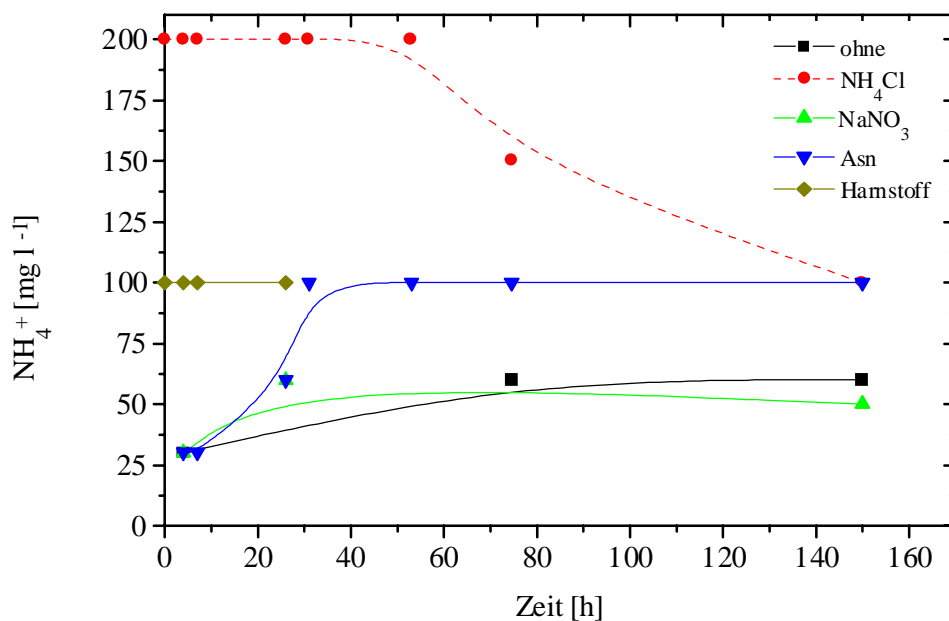


Abb. III.19: Extrazelluläre Ammoniumkonzentrationen bei Einsatz verschiedener N-Quellen.

Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; 20 % MB; 1 % Glukose; (Verhältnis: C:N, 5:1); 27°C; 100 Upm

4.2.4 Optimierung der Mediumszusammensetzung

Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen, aus denen hervorgeht, daß MH-Cr 6.3 Aminosäuren sowohl als N- als auch als C-Quelle verwertet, und bereits nach 10 h Kultivierung im Bioreaktor keine extrazellulären Aminosäuren im Medium mehr verfügbar sind, wurden die Pepton- und Hefeextraktkonzentrationen in MB-Medium variiert und die Konzentrationen für das optimale Wachstum bestimmt.

Wie aus Abb. III.20 hervorgeht wird bei Zusatz einer Hefeextraktkonzentration von 30 g l⁻¹ das maximale Wachstum mit einer optischen Dichte von 11,2 erreicht. Durch Zusatz verschiedener Peptonkonzentrationen wird das Wachstum ebenfalls verbessert, es werden jedoch insgesamt niedrigere Zelldichten erreicht als beim Zusatz von Hefeextrakt.

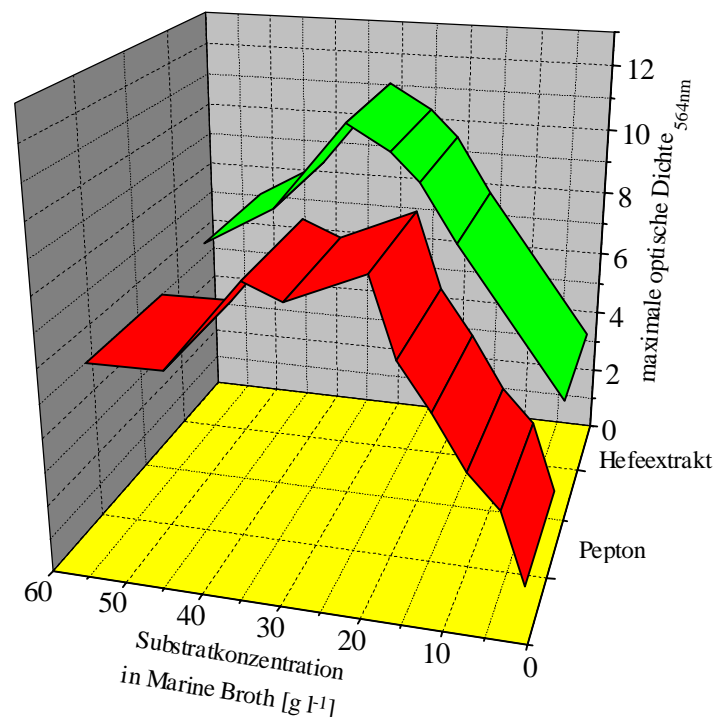


Abb. III.20: Variation der Substratkonzentrationen in Marine Broth-Medium.

Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; MB mit verschiedenen Hefeextrakt- oder Peptonkonzentrationen; 100 Upm; 27°C; 28 h

Da in MB-Medium eine Kombination von Hefeextrakt und Pepton vorliegt und aus vorangegangenen Untersuchungen hervorgeht, daß das Wachstum von beiden Substraten abhängt, wurde die optimale Kombination aus beiden ermittelt. Hierbei wurden Versuche mit

MB-Medium unter Zusatz von 30 g l^{-1} Hefeextrakt mit verschiedenen Peptonkonzentrationen durchgeführt. Durch Zusatz von 5 g l^{-1} Pepton wird eine maximale optische Dichte von 11,91 mit einer BTM von $10,45 \text{ g l}^{-1}$ erreicht (Abb. III.21). Höhere Peptonkonzentrationen wirken in Kombination mit 30 g l^{-1} Hefeextrakt wachstumshemmend.

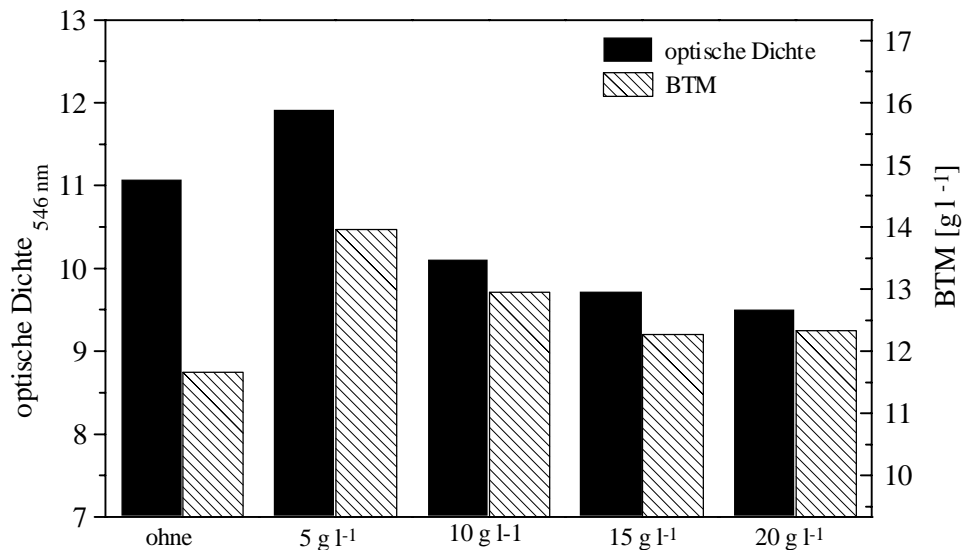


Abb. III.21: Variation der Peptonkonzentration.

Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; MB + 30 g l^{-1} Hefeextrakt mit verschiedenen Peptonkonzentrationen; 100 Upm; 27°C ; 28 h

Die Ergebnisse aus 4.2.2 haben gezeigt, daß Glukose als zusätzliche C-Quelle in MB-Medium von dem Organismus sehr gut verwertet wird. Daher wurde im dritten Schritt der Mediumsoptimierung der Einfluß der Glukose in Abhängigkeit von der Konzentration auf das Wachstum von MH-Cr 6.3 in MB-Medium mit 30 g l^{-1} Hefeextrakt und 5 g l^{-1} Pepton untersucht. Hierbei zeigt sich, daß ein Zusatz von 5 g l^{-1} Glukose zu einer Steigerung des Wachstums führt, aus der eine optische Dichte von 13,53 resultiert (Abb. III.22). Im Verlauf der Schüttelkolbenkultivierung werden $3,4 \text{ g l}^{-1}$ Glukose verbraucht. Höhere Glukosekonzentrationen führen zu keiner weiteren Wachstumssteigerung, sondern wirken inhibierend.

Als optimale Zusammensetzung für die Bildung hoher Biomassekonzentrationen hat sich ein Medium bestehend aus Marine Broth, 30 g l⁻¹ Hefeextrakt, 5 g l⁻¹ Pepton und 5 g l⁻¹ Glukose erwiesen. Bei allen durchgeführten Substratzusätzen wurden keine qualitativen Veränderungen des Produktspektrums beobachtet.

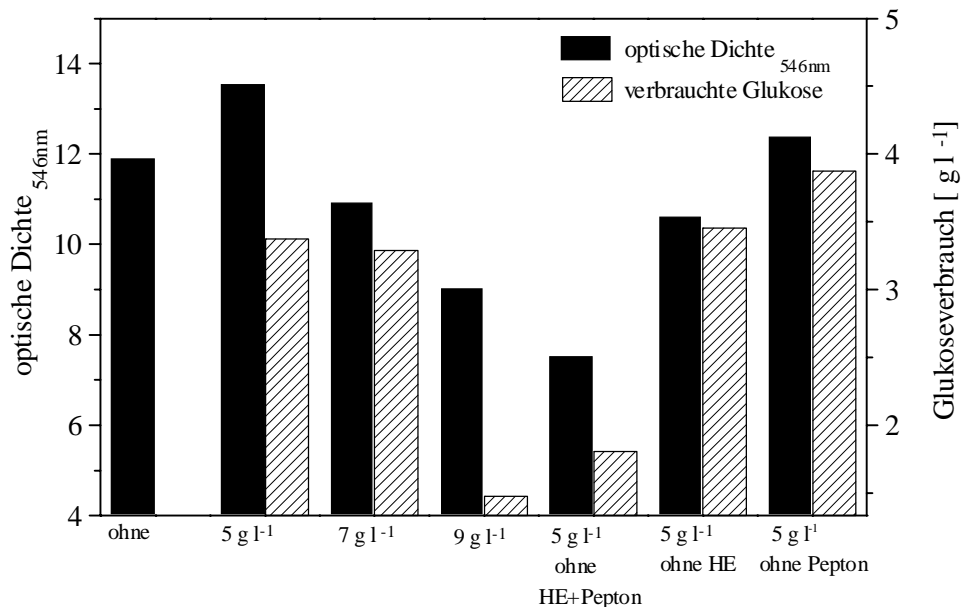


Abb. III.22: Variation der Glukosekonzentration.

Bedingungen: 100 ml Schüttelkoben; MB + 30 g l⁻¹ Hefeextrakt + 5 g l⁻¹ Pepton; 100 Upm; 27°C; 28,5 h

4.2.5 Optimierung der Wachstumstemperatur

Da das Bakterium aus einem marinen Habitat entnommen wurde, wo es wechselnden Temperaturen ausgesetzt war, sollte die optimale Wachstumstemperatur ermittelt werden. Die Steigerung der Biomasseproduktion, die durch die Verbesserung des Mediums erzielt werden konnte, sollte in einem weiteren Schritt in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht werden. Bei Verwendung des optimierten Mediums wurde das Wachstum und die Produktion für einen Temperaturbereich von 4°C bis 37°C untersucht. Aus Abb. III.23 geht hervor, daß es sich bei MH-Cr 6.3 um ein psychrotolerantes Bakterium handelt, dessen Temperaturoptimum bei 27°C liegt. Bei 4°C ist immer noch Wachstum möglich, jedoch stark

verlangsamt. Bei 27°C findet das stärkste Zellwachstum, die größte Metabolitproduktion und höchste Produktion antimikrobieller Fettsäuren statt. Die spezifische Aktivität des Zellextraktes ist jedoch bei einer Kultivierungstemperatur von 20°C höher als bei 27°C, da wie der Vergleich von Zellextrakt und Hemmhofdurchmesser zeigt, dort weniger Nebenprodukte gebildet werden.

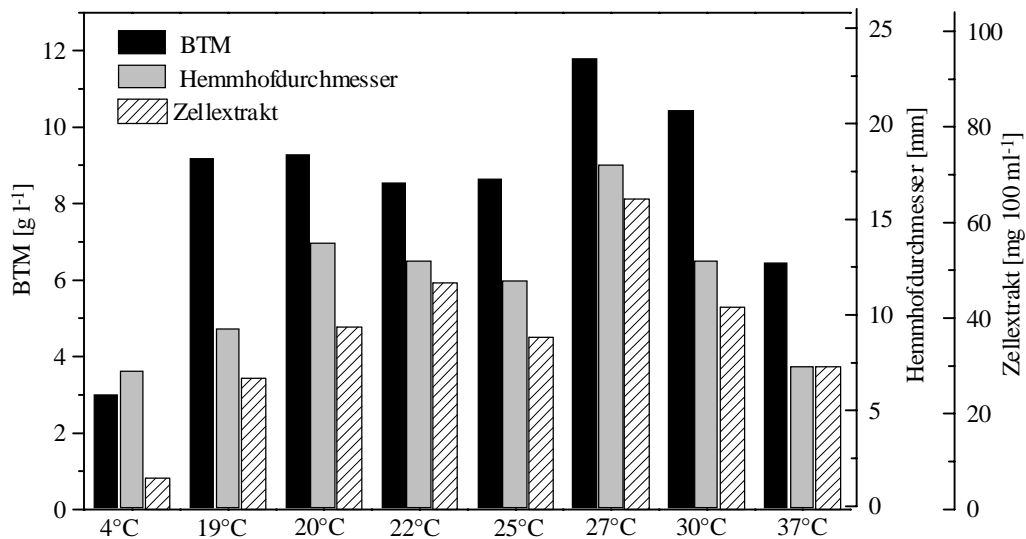


Abb. III.23: Wachstum und Produktion von MH-Cr 6.3 in Abhängigkeit von der Temperatur.

Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben; MB + 30 g l⁻¹ Hefeextrakt + 5 g l⁻¹ Pepton + 5 g l⁻¹ Glukose; 100 Upm; 48 h.

Im Gegensatz zum Temperaturoptimum bei 27°C für die Produktion der antimikrobiellen Fettsäuren nimmt die Glukoseverbrauchsrate mit steigender Temperatur zu (Abb. III.24). Bei 37°C wird pro Zelle mehr Glukose verbraucht als bei 27°C. Die Glukose wird daher nicht für den Aufbau von Zellmasse verwendet, sondern wird wahrscheinlich zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels benötigt.

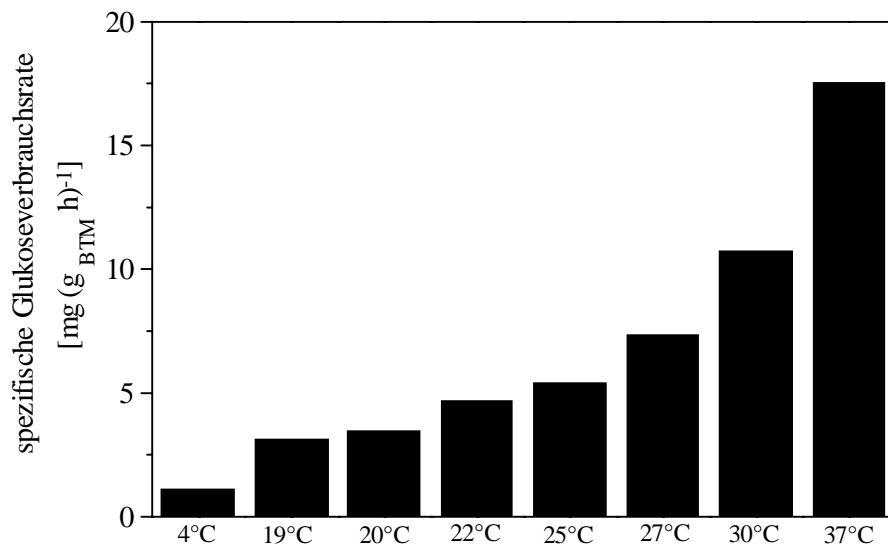


Abb. III.24: Spezifische Glukoseverbrauchsrate von MH-Cr 6.3 in Abhängigkeit von der Temperatur.

Bedingungen: 100 ml Schüttelkolben, MB + 30 g l⁻¹ Hefeextrakt + 5 g l⁻¹ Pepton + 5 g l⁻¹ Glukose; 100 Upm; 48 h.

4.2.6 Optimierung der Begasungsrate

Für das Wachstum von aeroben Mikroorganismen ist eine ausreichende Sauerstoffversorgung eine wichtige Voraussetzung. Stoffwechselprozesse werden unter anderem von der Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Nährmedium beeinflusst. Das Verhältnis der Gelöstsauerstoffkonzentration zur spezifischen Sauerstoffaufnahme folgt dem typischen Michaelis-Menten Verlauf. Daher muß zur Produktion der maximalen Zellmasse eine Mindestkonzentration (kritische Konzentration) überschritten werden [Ward 1994]. Da die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser sehr gering ist, muß dem Bioreaktor kontinuierlich Sauerstoff durch Belüften zugeführt werden. Die hohe Salzkonzentration im Medium reduziert zusätzlich noch die Sauerstofflöslichkeit im Wasser.

Es wurden aufeinanderfolgend sechs unabhängige Bioreaktorkultivierungen mit variiert Begasungsrate durchgeführt, um die geeignete Begasungsrate für unlimitedes Wachstum zu ermitteln. Für alle Bioreaktorkultivierungen wurde die gleiche Vorkultur, die täglich neu überimpft wurde, verwendet. Die Bioreaktorkultivierungen wurden über einen Zeitraum von

20 h verfolgt und die exponentiellen Wachstumsphasen in Hinblick auf schnelles Wachstum und hohe Biomasseproduktion miteinander verglichen. Als Medium wurde das optimierte Medium ohne Hefeextrakt verwendet, um ein etwas langsames Bakterienwachstum über 20 h verfolgen zu können. Als Problem bei der Durchführung erwies sich die mit steigender Begasungsrate zunehmende Schaumbildung, die die pO_2 -Messung erschwerte und eine häufige Zudosage von Ukolub erforderlich machte.

Als Vergleich wurden die Daten nach 6 h Kultivierung zugrunde gelegt, da zu diesem Zeitpunkt bei allen Kultivierungen das exponentielle Wachstum eingesetzt hatte und bei der Kultivierung 0,2 v/vm und 0,3 v/vm kurze Zeit später bereits die gesamte Glukose verbraucht war.

Bei einer Begasungsrate von 0,1 v/vm ist keine ausreichende Sauerstoffversorgung der Zellen erreichbar, was aus der Verzögerung des Wachstums und der Produktbildung gegenüber den höheren Begasungsraten zu erkennen ist. Das maximale Wachstum von MH-Cr 6.3 erfolgt bei den Begasungsraten von 0,2 v/vm und 0,3 v/vm, die bei hohen Zellproduktionen auch den höchsten Glukoseverbrauch aufweisen (Abb. III.25). Bei einer weiteren Erhöhung der Begasungsrate ist ein wachstumsinhibierender Effekt durch Sauerstoff zu beobachten. Die nach 6 h erreichten Zellkonzentrationen bei Begasungsraten $\geq 0,4$ v/vm liegen deutlich unter den erreichten Zelldichten, die mit den Begasungsraten von 0,2 und 0,3 v/vm erzielt werden.

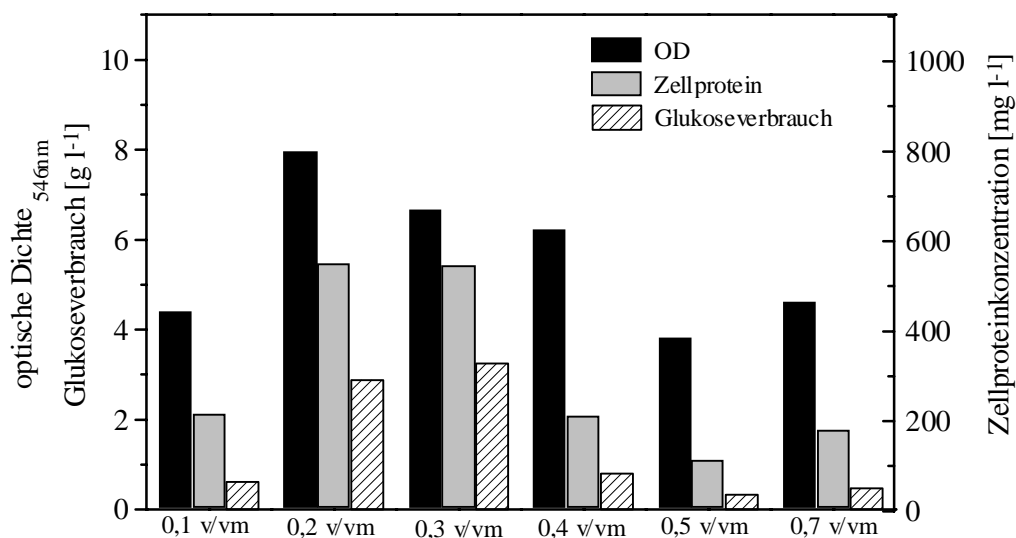


Abb. III.25: Abhängigkeit des Wachstums von MH-Cr 6.3 von der Begasungsrate.

Bedingungen: 10 l Bioreaktor; MB + 5 g l⁻¹ Pepton + 5 g l⁻¹ Glukose; 880 Upm; 27°C; pH: 7,6 ± 0,2; 6 h

Da der Energieeintrag bei einer Kultivierung möglichst gering sein sollte, ist aus energetischen Gesichtspunkten eine Begasungsrate von 0,2 v/vm gegenüber 0,3 v/vm zu bevorzugen. Die Produktion der antimikrobiellen Fettsäuren hat bereits nach 6 h Kultivierung bei allen Begasungsraten außer bei 0,1 v/vm begonnen. In der stationären Wachstumsphase sind in allen Zellextrakten antimikrobielle Aktivitäten nachweisbar.

4.3 Kultivierung im 50 l Bioreaktor unter optimierten Bedingungen

Aus den vorangegangenen Untersuchungen konnten die optimalen Wachstumsbedingungen für MH-Cr 6.3 ermittelt werden. Als weiteres Experiment sollten die erhaltenen Erkenntnisse bezüglich Mediumszusammensetzung, Temperatur und Sauerstoffversorgung auf eine Bioreaktorkultivierung angewendet werden. Abb. III.26 gibt eine Zusammenfassung des Kultivierungsverlaufs im 50 l Bioreaktor.

Die Biomassekonzentration steigt bis zu einer Kultivierungsdauer von etwa 8,5 h auf einen Wert von 15,91 g l⁻¹ und fällt anschließend innerhalb von 16,5 h auf eine Konzentration von 12,2 g l⁻¹ ab. Die maximale Wachstumsrate wird nach 4,5 h erreicht und beträgt 0,62 h⁻¹. Die Glukose ist im Unterschied zum Schüttelkolben bereits nach 10 h vollständig verbraucht. Die pH-Schwankungen, die im Schüttelkolben bei Glukoseverbrauch beobachtet wurden, werden im Bioreaktor durch pH-Regelung verhindert. Bei Verwendung des optimierten Mediums werden mehr antimikrobielle Fettsäuren produziert als in reinem MB-Medium. Im Zellextrakt ist nach 3,3 h bereits Produkt nachweisbar und nach 4,5 h sogar im Überstand. Das Maximum der Produktkonzentration in den Zellen wird nach 11,5 h mit 0,75 g l⁻¹ Zellextrakt (16,5 mm, Verd. 1:75) erreicht und sinkt gegen Ende der Kultivierung erstmals zu Gunsten der Konzentration im Überstand leicht ab (13,5 mm, Verd. 1:50). Anhand der starken Zunahme der antimikrobiellen Wirkung im Vergleich zur Rohextraktzunahme wird deutlich, daß der Anteil der antimikrobiellen Fettsäuren im Zellrohextrakt gestiegen ist. Die maximalen Konzentrationen der antimikrobiellen Fettsäuren betragen für C16:1 287 mg l⁻¹ und C17:1 39 mg l⁻¹, was im Vergleich zu der Kultivierung in MB-Medium eine Steigerung der Produktmenge um den Faktor 5,6 bedeutet. Die Konzentration der C16:1 im Überstandsextrakt beträgt 93 mg l⁻¹ und C17:1 12 mg l⁻¹. Das Produktspektrum für Zellen und Überstand ist qualitativ in Abb. III.27 dargestellt. Die Spots der isolierten β -Hydroxy-

fettsäuren sind im Zellextrakt zwischen 3,3 und 6,5 h nachweisbar und verschwinden anschließend wieder.

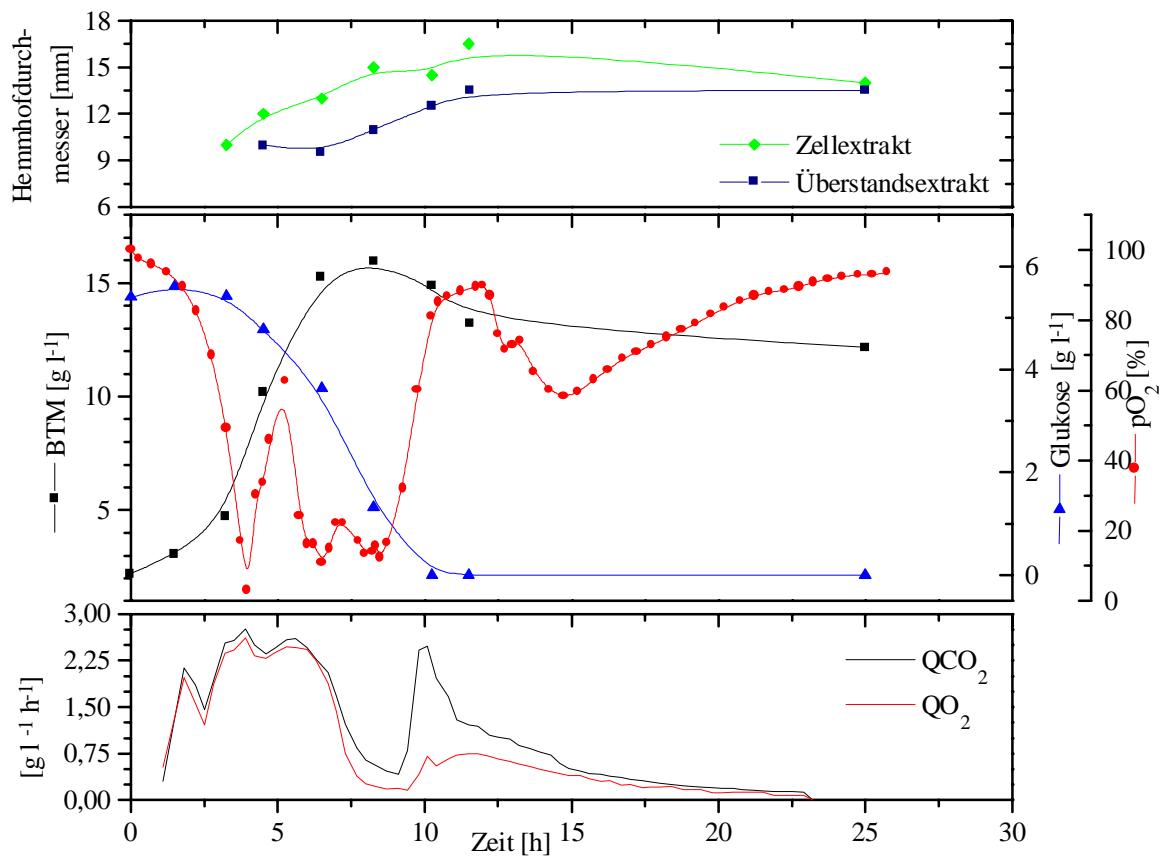


Abb. III.26: Batch-Kultivierung von MH-Cr 6.3 im Bioreaktor unter optimierten Bedingungen.

Bedingungen: 50 l Bioreaktor; 30 l MB-Medium + 30 g l⁻¹ Hefeextrakt + 5 g l⁻¹ Pepton + 5 g l⁻¹ Glukose; 520 Upm; 27°C; pH 7,6 ± 0,2; 0,2 v/vm; 10 % Inokulum

Bereits nach 4,5 h sind die Aminosäuren Asn, Arg und His unter hoher Sauerstoffaufnahme und CO₂-Bildung vollständig verbraucht und nach 6,5 h Ser, Thr und Phe. In dem Zeitraum zwischen 3,25 und 6,5 h ist ein Anstieg der Glycinkonzentration von 0,4 auf 0,8 g l⁻¹ bei vermindertem Sauerstoffverbrauch zu beobachten (Abb. III.28). In der exponentiellen Phase wird bis zum Wiederanstieg der pO₂-Konzentration auf 60 % (5,5 h) durch Titration mit NaOH einem pH-Abfall entgegengewirkt. Anschließend steigt der pH-Wert bei steigendem Sauerstoffverbrauch, so daß eine vermehrte Säuretitration beobachtet wird (5,5 h-Ende). Nach 10 h sind alle freien Aminosäuren, die zu Beginn der Kultivierung in Konzentrationen von 0,5 bis 2 g l⁻¹ vorhanden waren, verbraucht. Anhand der pO₂-Kurve kann der Abbau der

verschiedenen Substrate beobachtet werden. Zu keinem Zeitpunkt tritt eine Phosphatlimitierung ein (Daten nicht gezeigt).

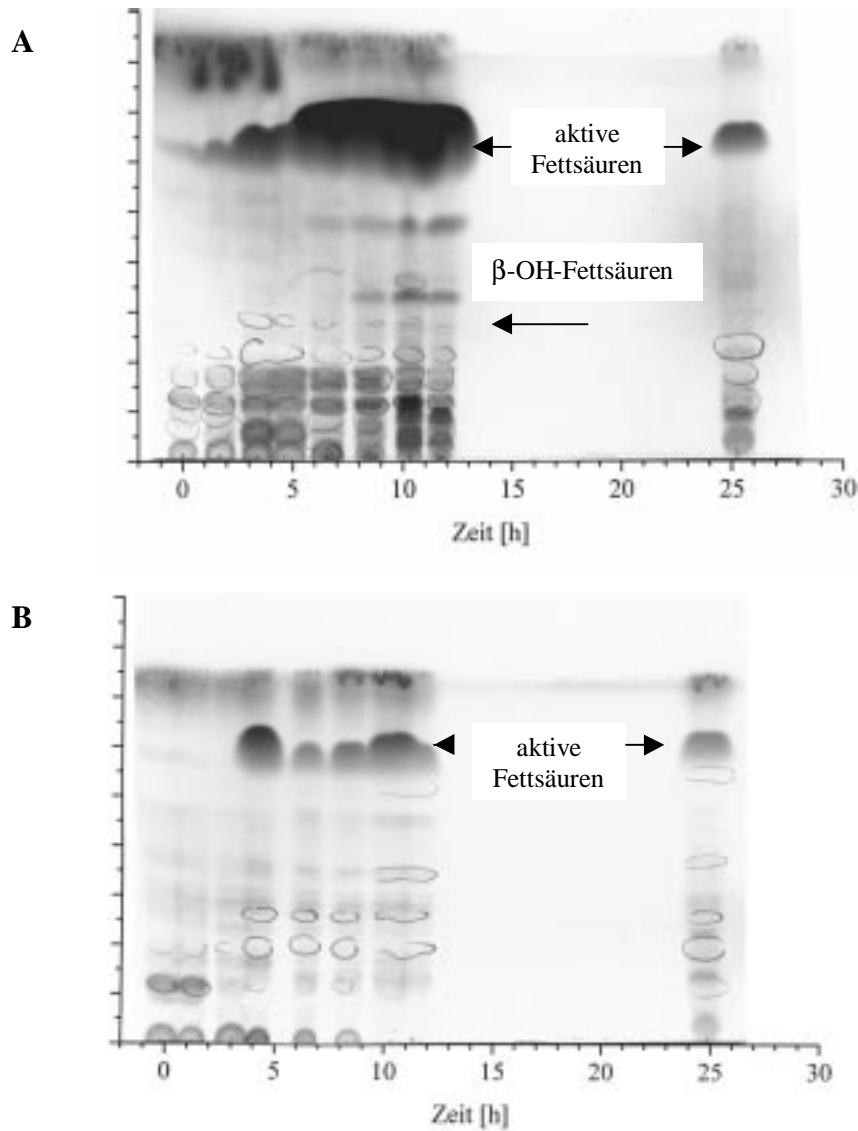


Abb. III.27: Produktspektrum im Verlauf einer Batch-Kultivierung von MH-Cr 6.3.
Bedingungen: 50 l Bioreaktor; 30 l MB-Medium + 30 g l⁻¹ Hefeextrakt + 5 g l⁻¹ Pepton + 5 g l⁻¹ Glukose; 520 Upm; 27°C; pH 7,6 ± 0,2; 0,2 v/vm; 10 % Inokulum.
A : intrazellulärer Metabolitkonzentrationsverlauf
B : extrazellulärer Metabolitkonzentrationsverlauf

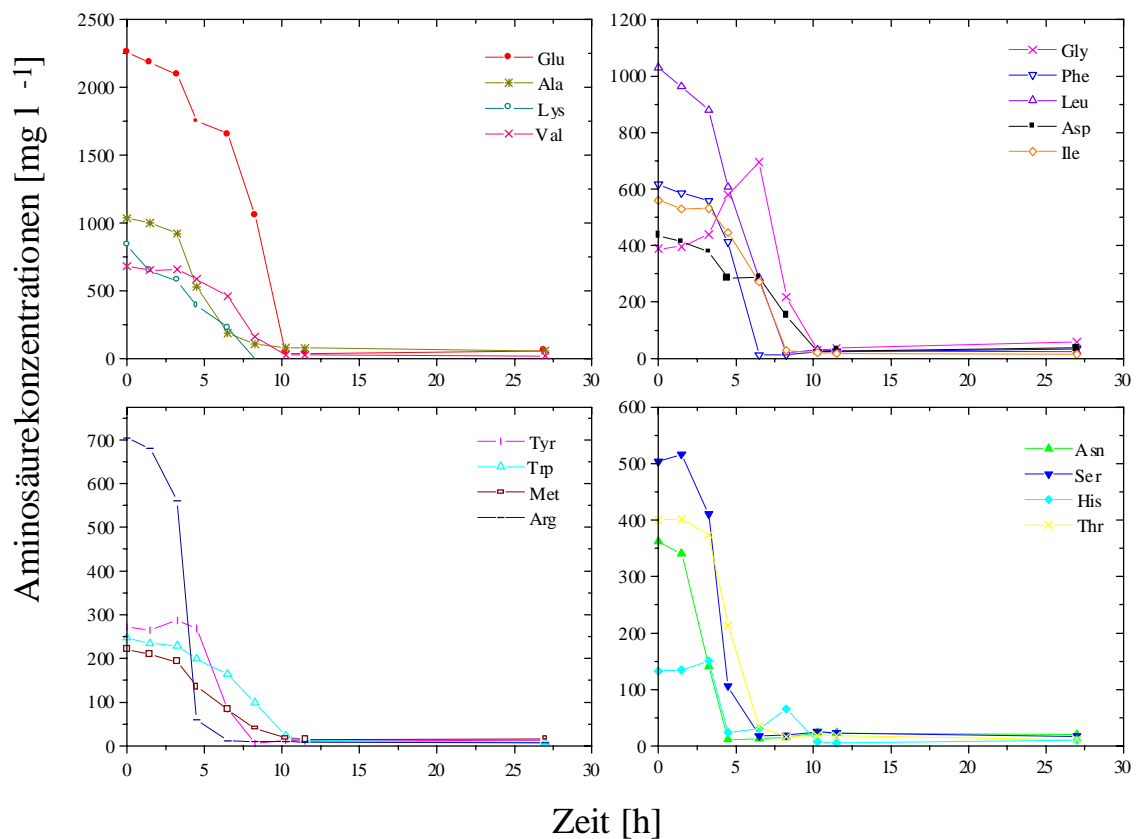


Abb. III.28: Aminosäurekonzentrationen im Verlauf einer Batch-Kultivierung von MH-Cr 6.3 im Bioreaktor unter optimierten Bedingungen.

Bedingungen: 50 l Bioreaktor; 30 l MB-Medium + 30 g l⁻¹ Hefeextrakt + 5 g l⁻¹ Pepton; 5 g l⁻¹ Glukose; 520 Upm; 27°C; pH 7,6 ± 0,2; 0,2 v/vm; 10 % Inokulum

4.4 Fed-Batch-Kultivierung im Bioreaktor

Nachdem in den bisherigen Versuchen gezeigt werden konnte, daß die Produktion der antimikrobiellen Fettsäuren mit dem Wachstum gekoppelt ist, sollte in einem weiteren Versuch mit Hilfe einer Fed-Batch-Strategie die Wachstumsphase von MH-Cr 6.3 verlängert werden, um insgesamt eine höhere Produktmenge zu erzielen. Für ein anderes marines Bakterium (*Alteromonas putrefaciens*) konnte im Rahmen einer automatisierten Fed-Batch-Kultivierung unter Zudosage von Pepton und Hefeextrakt (2:1) nach ca. 22 h eine maximale Zellkonzentration von 45 g l⁻¹ (von 28 g l⁻¹) erreicht werden [Hibiono *et al.* 1993].

Im Unterschied zu der vorangegangenen Bioreaktorkultivierung wurde die doppelte Substratmenge an Hefeextrakt innerhalb von 48 h kontinuierlich zudosiert. Der Kultivierungsverlauf ist in Abb. III.29 zusammengefaßt.

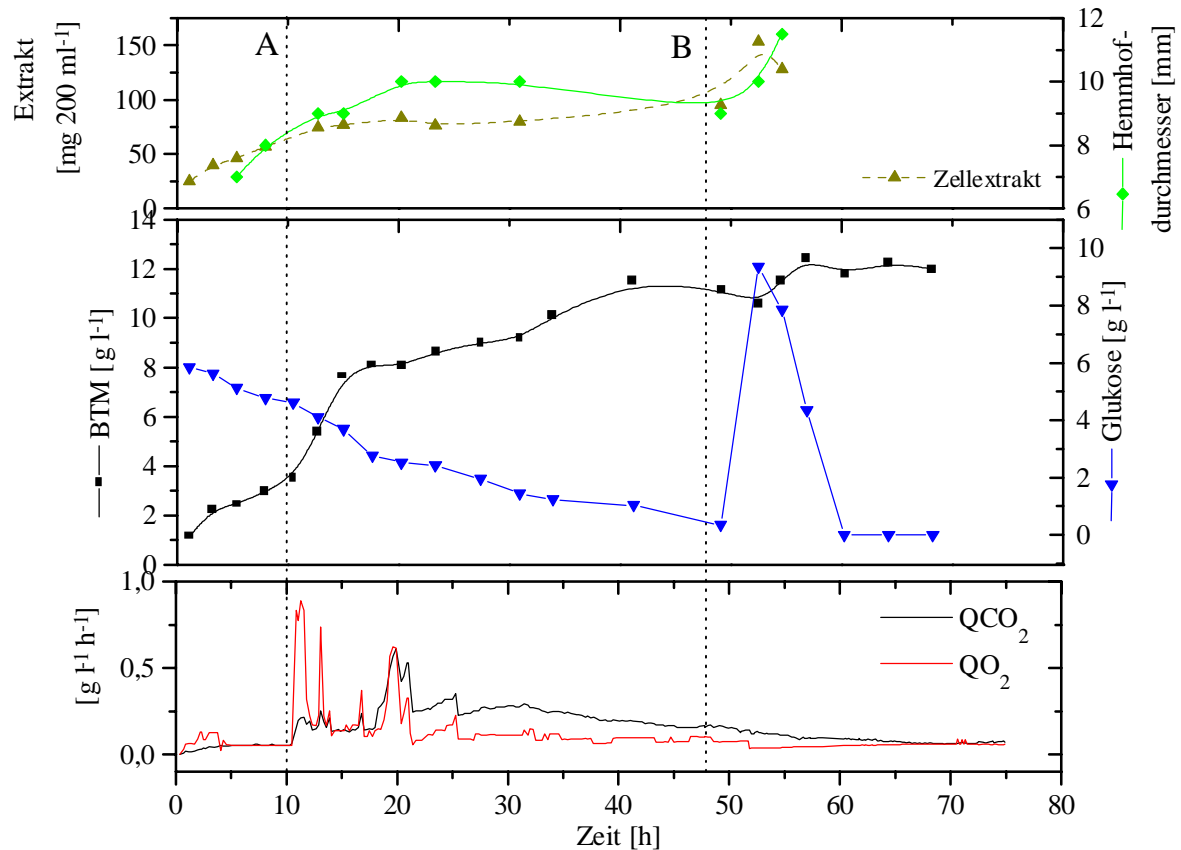


Abb. III.29: Fed-Batch-Kultivierung von MH-Cr 6.3 im Bioreaktor.

Bedingungen: 10 l Bioreaktor; 10 l MB-Medium + 5 g l^{-1} Pepton + 5 g l^{-1} Glukose; 880 Upm; 27°C; pH $7,6 \pm 0,2$; 0,3 v/vm; 10 % Inokulum; Zudosage von 500 g Hefeextrakt ($D = 0,083 \text{ h}^{-1}$); Zugabe von 1 ml Ucolub nach 10 h (A); Zugabe von 9,8 g l^{-1} Glukose nach 48 h (B)

Nach 10 h Kultivierung wurde zur Schaumverminderung 1 ml Ucolub hinzugefügt, da bis zu diesem Zeitpunkt bei starker Schaumbildung eine Wachstumsverzögerung zu beobachten war. Die pO_2 -Messung war zu diesem Zeitpunkt aufgrund der starken Schaumbildung nicht möglich.

Der Organismus zeigt über einen längeren Zeitraum ein geringeres Wachstum als bei der Batch-Kultivierung mit einer maximalen Biomassekonzentration von nur 12,42 g l^{-1} und einer maximalen Wachstumsrate von 0,29 h^{-1} . Nach 48 h wurde die Hefeextraktzudosage beendet. Erst zu diesem Zeitpunkt sind 5 g l^{-1} Glukose verbraucht. Die gleiche Menge Glukose wurde

unter Batch-Bedingungen bereits innerhalb von 10 h verstoffwechselt. Die Zugabe von $9,8 \text{ g l}^{-1}$ Glukose nach 48 h führt zu einem weiteren jedoch nur geringen Anstieg der Biomassekonzentration. Die Verwertung bzw. Aufnahme von Glukose ist von der extrazellulären Substratkonzentration abhängig. Aufgrund der doppelten Menge Glukose ist eine doppelt so hohe spezifische Glukoseverbrauchsrate zu beobachten. Die hohe Biomassekonzentration führt dazu, daß innerhalb der folgenden 10 h die zugefütterte Glukose vollständig verwertet wird (Abb. III.30). Während dieser Bioreaktorkultivierung sind nach 4,5 h antimikrobielle Fettsäuren nachweisbar, deren Konzentrationen im Zellextrakt ($0,4 \text{ g l}^{-1}$) über den gesamten Zeitraum etwa konstant bleiben (10 mm, Verd. 1:75). Die Konzentrationen der antimikrobiellen Fettsäuren betragen C16:1 60 mg l^{-1} und C17:1 8 mg l^{-1} .

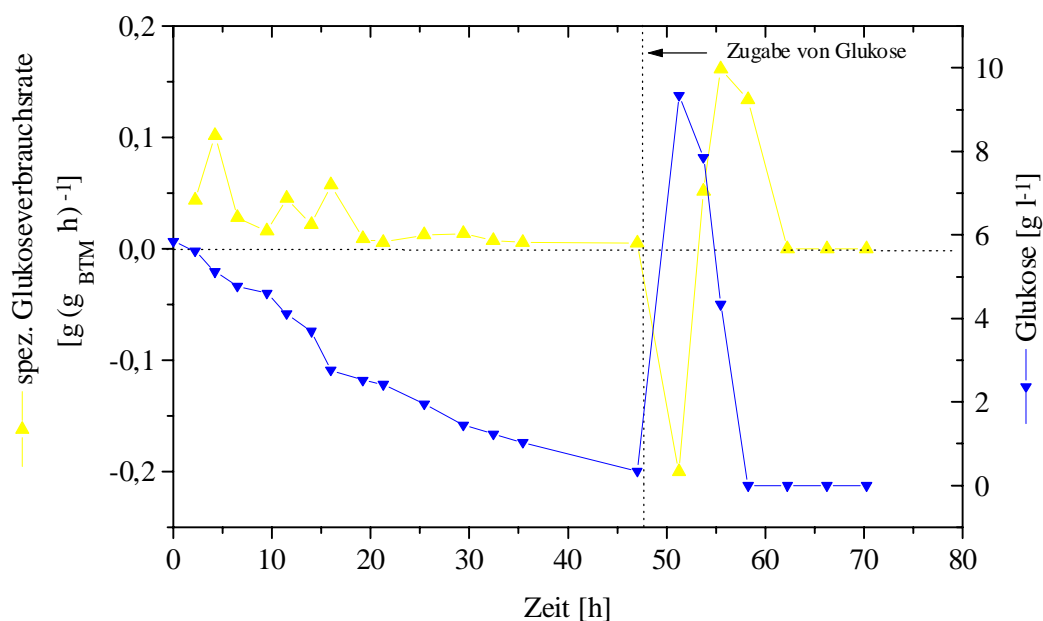


Abb. III.30: Abhängigkeit der spezifischen Glukoseverbrauchsrate bei MH-Cr 6.3 von der Glukosekonzentration in einer Fed-Batch-Kultivierung.

Bedingungen: 10 l Bioreaktor; 10 l MB-Medium + 5 g l^{-1} Pepton + 5 g l^{-1} Glukose; 880 Upm; 27°C ; $\text{pH } 7,6 \pm 0,2$; 0,3 v/vm; 10 % Inokulum; Zudosage von 500 g Hefeextrakt ($D = 0,083 \text{ h}^{-1}$); Zugabe von 1 ml Ucolub nach 10 h; Zugabe von $9,8 \text{ g l}^{-1}$ Glukose nach 48 h

Während der Zudosage werden die Aminosäuren Arg, Ser, Thr schneller verbraucht als nachgeliefert. Die Aminosäure Arg ist bereits nach 10 h vollständig verbraucht. Erst anschließend werden die Aminosäuren Ser und Thr verstoffwechselt. Die Konzentration von

Asn bleibt während der Zudosage etwa konstant, da soviel zudosiert wird wie auch verwertet wird. Alle anderen Aminosäurekonzentrationen steigen während der Zudosage bis zu einer Kultivierungszeit von 35 h kontinuierlich an und sinken erst nach Beendigung der Zudosage gegen Null ab (Abb. III.31).

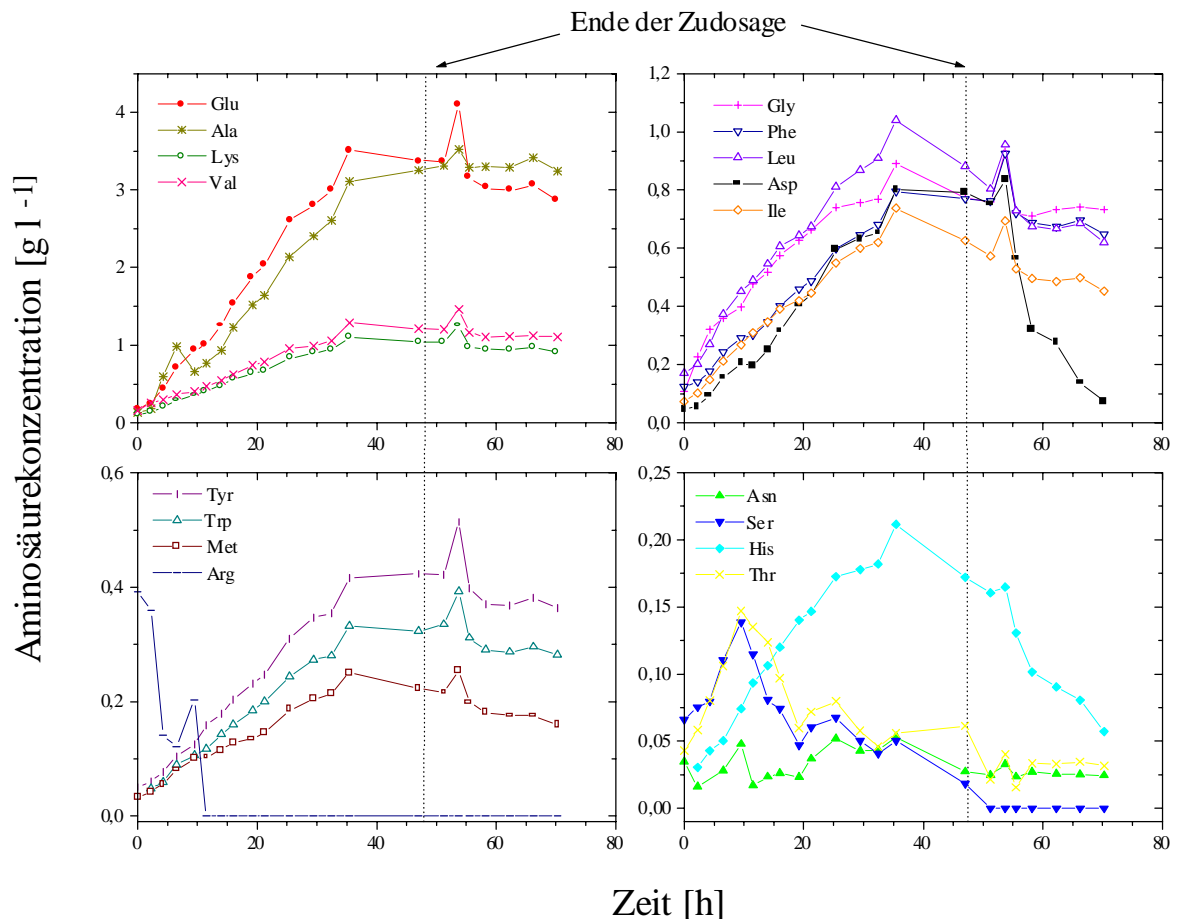


Abb. III.31: Aminosäurekonzentrationen im Verlauf einer Fed-Batch-Kultivierung von MH-Cr 6.3 im Bioreaktor.

Bedingungen: 10 l Bioreaktor; 10 l MB-Medium + 5 g l⁻¹ Pepton + 5 g l⁻¹ Glukose; 880 Upm; 27°C; pH 7,6 ± 0,2; 0,3 v/vm; 10 % Inokulum; Zudosage von 500 g Hefeextrakt (D = 0,083 h⁻¹); Zugabe von 1 ml Ucolub nach 10 h; Zugabe von 9,8 g l⁻¹ Glukose nach 48 h

IV. Diskussion

1. Screening

Eine Übersicht zur Vorgehensweise beim Screening nach biologisch aktiven Substanzen ist in Abb. IV.1 zusammengefaßt. Im Laufe von zwei Jahren wurden aus fünf verschiedenen Schwämmen ca. 50 verschiedene marine Mikroorganismen isoliert. Aufgrund der Tatsache, daß in Meerwasser etwa 1×10^6 Zellen pro Milliliter vorhanden sind und Bakterien aufgrund des besseren Nährstoffangebotes bevorzugt in Assoziation mit anderen Organismen vorkommen [Jensen & Fenical 1996], erscheint die Anzahl der Bakterienisolate sehr niedrig. Da jedoch unter Standardbedingungen nur $< 5\%$ aller marinen Bakterien kultivierbar sind [deVries & Hall 1994], ist die geringe Anzahl wiederum verständlich. Die unterschiedliche Anzahl der Bakterienisolate in Screening I und II ist einerseits auf verschiedene Screeningverfahren zurückzuführen, andererseits auf natürliche Schwankungen der Umweltbedingungen der Schwämme und der mit ihnen assoziierten Bakterien. Die Zusammensetzung der Bakterienpopulationen ist stark von den jeweiligen physikalischen, chemischen und biologischen Bedingungen abhängig. Es muß von lokalen und jahreszeitlichen Schwankungen im Nährstoffangebot, der Sauerstoffversorgung, des pH-Wertes und der Temperatur ausgegangen werden.

Neben der Isolatgewinnung von MB-Agar wurde das Screeningverfahren dahingehend erweitert, daß auch Bakterien isoliert wurden, die zuerst in Flüssigkultur angereichert und anschließend auf festem Medium zum Wachsen gebracht wurden. 23,5 % aller Bakterien aus Screening II wurden mit diesem Verfahren isoliert. Aufgrund der nicht limitierten Anzahl der Agarplatten und der besseren Lagerkapazitäten im heimischen Institut in Braunschweig (Screening II) im Vergleich zu den begrenzten Möglichkeiten am Institut in Rovinj (Screening I), konnten in Screening II alle Bakterien sofort vereinzelt werden. Somit wurde die Unterdrückung bzw. das Überwachsen eines Stammes durch einen schneller wachsenden weitestgehend verhindert.

Wie auch bei anderen Invertebraten beobachtet wurde [Jensen & Fenical 1996], ist bei *Crella rosea* die Anzahl der Bakterien außerhalb des Schwammes viel geringer und weist Unterschiede der Species im Vergleich zu den assoziierten Bakterien auf.

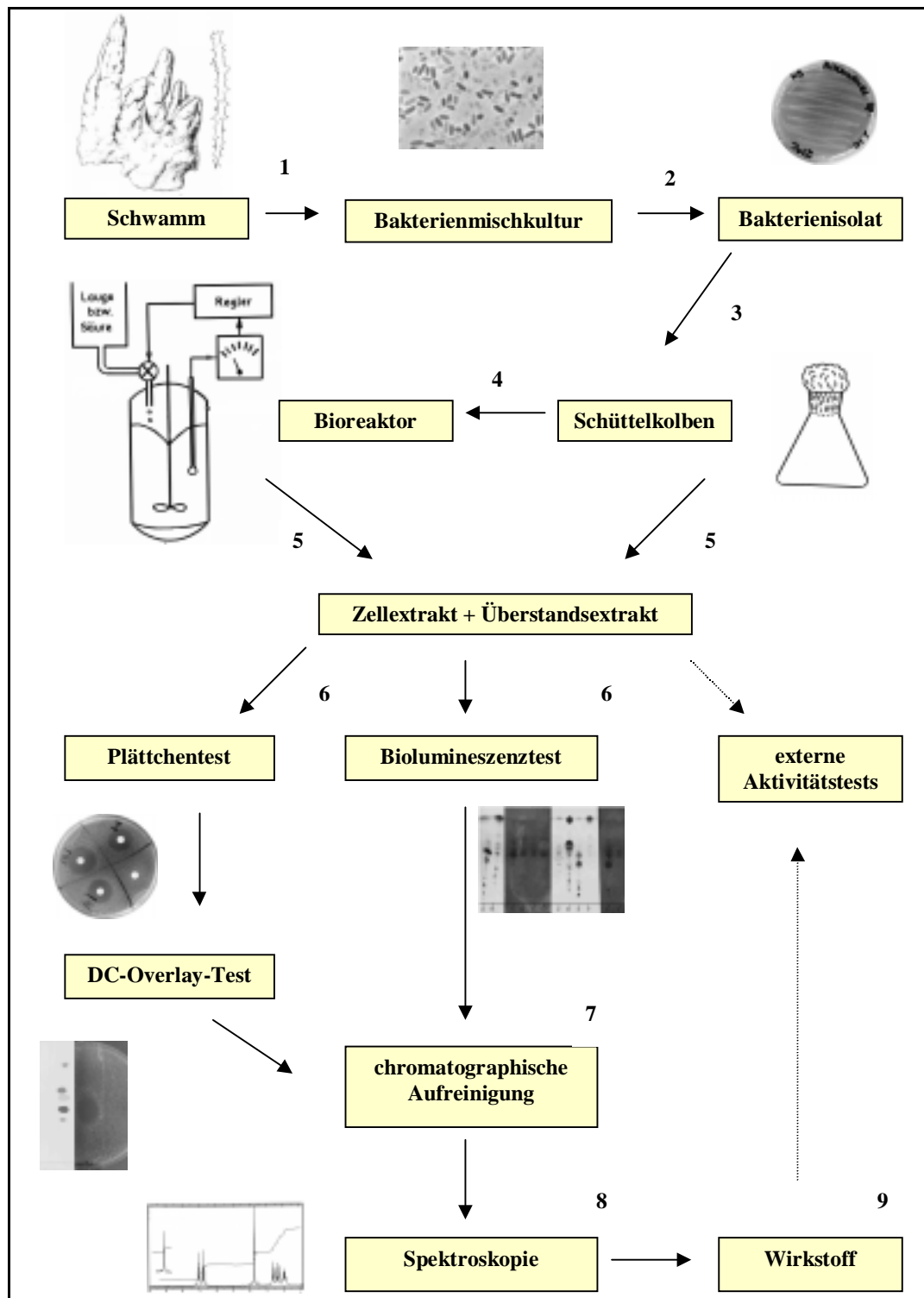


Abb. IV.1: Vorgehensweise beim Screening nach biologisch aktiven Substanzen aus schwammassoziierten Bakterien.

1. Isolierung von Bakterien aus Schwammexpressungen; 2. Herstellung von Reinkulturen; 3. Kultivierung der Isolate in flüssigem Medium; 4. Scale up, Kultivierung der Isolate im Bioreaktor; 5. Extraktion von Zellen und Überstand; 6. Durchführung verschiedener Aktivitätstests, Detektion der wirksamen Substanz auf der DC; 7. Chromatographische Aufreinigung; 8. Strukturaufklärung durch Aufnahme von NMR- und Massenspektren; 9. Reinsubstanz mit biologischer Aktivität

Das Verhältnis von grampositiven zu gramnegativen Bakterien ist im marinen und terrestrischen Bereich sehr unterschiedlich. 80 – 95 % aller kultivierbaren marinen Bakterien sind gramnegativ, im Vergleich dazu sind es im terrestrischen nur 27 – 36 % aller Bakterien [deVries & Hall 1994]. In dem Schwamm *Crella rosea* ist das typische Verhältnis der marinen Bakterien leicht verschoben. Hier verteilt sich die Bakterienpopulation zu 59 % auf gramnegative und 41 % auf grampositive Bakterien. Grampositive Bakterien kommen im Vergleich zu gramnegativen gewöhnlich in nährstoffreicheren Habitaten vor [Fenical 1993]. Da der Lebensraum „Schwamm“ nährstoffreicher ist als das Meerwasser und auch als die meisten Sedimente, stellt diese ökologische Nische für grampositive Bakterien eine bevorzugte Umgebung dar. Im Gegensatz zu der Verteilung bei den mit *Crella rosea* assoziierten Bakterien sind nur 25 % der Bakterien aus der unmittelbaren Umgebung grampositiv.

Die Zusammensetzung der Bakterienpopulation in Schwämmen wird häufig durch die Bildung eines Schwammmetaboliten beeinflusst. Der Schwamm *Verongia aerophoba* produziert als Schutz vor Überwucherung das Tyrosin-Derivat Aeroplysinin, das neben der wachstumshemmenden Wirkung gegenüber Bakterien und Algen auch das Wachstum von menschlichen Tumorzellen inhibiert. Der Schwamm *Luffariella variabilis* produziert Manolid, das antibakterielle Eigenschaften nur gegenüber grampositiven Bakterien besitzt [Müller & Schröder 1997]. Aus der Gattung *Crella* sp. wurden biologisch aktive Bissterioide isoliert, deren Untereinheiten über ihre Seitenketten dimerisiert sind. Diese Verbindungen blockieren den Zellzyklus in der G1-Phase von NSCLC-16 Krebszellen [Lindel 1998]. Vielleicht besitzen die Metabolite des Schwammes *Crella rosea* auch antibakterielle Eigenschaften.

Da der Stamm MH-Cr 6.3 nur in Screening I gefunden wurde, handelt es sich in diesem Fall möglicherweise um eine kurzzeitige Assoziation des Bakteriums mit *Crella rosea* aufgrund günstiger Umweltbedingungen. Die Identifizierung des Stammes MH-Cr 6.3 zeigte, daß dieser Stamm zu der Gattung *Pseudoalteromonas* gehört. Der nah verwandte Stamm *Alteromonas rubra* (1995 umbenannt in *Pseudoalteromonas rubra* comb. nov. [Gauthier *et al.* 1995]) wurde während der Herbstmonate aus dem Mittelmeer isoliert [Gerber & Gauthier 1979]. Saisonale Untersuchungen über zwei Jahre zeigen, daß das Auftreten der Gattung *Pseudoalteromonas* regelmäßig in den Monaten von August bis Dezember zu beobachten ist. Verschiedene Species der Gattung erscheinen, wenn die Phytoplanktonzusammensetzung reich an Diatomeen ist und verschwinden wieder, wenn die Dinoflagellaten in der

Phytoplanktonzusammensetzung dominieren. Vermutlich besitzen diese Bakterien eine bestimmte Aufgabe in der mikrobiellen Ökologie des Meeres [Gauthier 1975]. Da die saisonale Phytoplanktonzusammensetzung neben der Sonneneinstrahlung auch stark vom Nährstoffangebot abhängig ist, können leicht jahreszeitliche Verschiebungen auftreten, so daß im Monat August in zwei verschiedenen Jahren nicht zwangsläufig jedesmal die Gattung *Pseudoalteromonas* gefunden wird.

Aufgrund der geringen Produktausbeuten bei marinen Bakterien, die meistens im Bereich von 1 mg l^{-1} liegen, war eine Vergrößerung des Ansatzes erforderlich. Neben der Erhöhung der Anzahl der Schüttelkolbenkultivierungen bestand die Möglichkeit eine Bioreaktorkultivierung durchzuführen. Nach Etablierung eines geeigneten Aufarbeitungsverfahrens, bei dem sich die getrennte Aufarbeitung von Zellen und Überstand als optimal erwiesen hat, stellt sich die Frage nach der Wahl der Aktivitätstests. Es gibt eine Vielzahl von Screeningmethoden [Hill *et al.* 1998, Gräfe *et al.* 1989, Koch 1992], daher bietet sich eine Zusammenarbeit mit anderen Instituten und Firmen an, damit ein breites Wirkspektrum abgedeckt wird.

Die Zell- und Überstandsextrakte aller Bakterienisolate wurden auf antibakterielle, fungizide, algizide und toxische Aktivitäten getestet. Diese biologischen Aktivitätstests wurden durch extern durchgeführte Tests ergänzt, in denen weitere Wirkungen ermittelt werden sollten. Die externen Tests erwiesen sich jedoch für ein Screening als ungeeignet, da durch Verwendung der Rohextrakte eine zusätzliche Verdünnung der eingesetzten sehr geringen Testkonzentrationen ($10\text{-}300 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$) erfolgt und somit mögliche Wirkstoffe im Rohextrakt nicht gefunden werden. Weiterhin treten Probleme auf, wenn sowohl Agonisten als auch Antagonisten im Rohextrakt enthalten sind, da Effekte überlagert werden können. Das bedingt einerseits falsch-positive Ergebnisse, andererseits werden bioaktive Komponenten möglicherweise nicht entdeckt. Diese Tatsache erwies sich insbesondere bei den neuroprotektiven Tests als Problem, da bereits bei Anwesenheit von Glycin oder Glutamat, agonistische oder antagonistische Effekte im Extrakt zu beobachten waren. Aufgrund dieser Erfahrungen wurden nur noch Reinsubstanzen für die externen Tests verwendet. Eine Ausnahme bei den externen Tests stellen der zytotoxische und nemazide Test am Institut für Pharmazie dar, da hier höhere Ausgangskonzentrationen eingesetzt werden.

Die Durchführung des Plättchentests zur Detektion antibakterieller, fungizider und algizider Wirkungen erwies sich als sehr gut geeignet, da bei einfacher Handhabung ein schnelles

Ergebnis erhalten wird. Außerdem handelt es sich hierbei um kostengünstige Tests. Der Nachweis antimikrobieller Aktivitäten ist häufig auch ein erstes Indiz für andere biologische Aktivitäten. Daher wird dieser Test in vielen Screenings durchgeführt. In Kombination mit dem DC-Overlay-Test stellt diese Vorgehensweise eine gute Basis für eine anschließende Strukturisolierung dar.

Die Detektion der toxischen Substanzen mittels Biolumineszenz-Test stellt eine Ergänzung des Screenings dar, ist jedoch als alleiniger Screeningparameter nicht geeignet. Der Test ist sehr empfindlich, daher ist die Anzahl der detektierten toxischen Substanzen sehr hoch und in fast jedem Extrakt eine Wirkung erkennbar. Die Möglichkeit der direkten Detektion auf der DC erhöht die Attraktivität dieses Tests und verhindert die Irreführung durch hohe Aktivitäten im Extrakt, da gleich Rückschlüsse auf die Substanzgruppe gezogen werden können.

In dem Screening nach antimikrobiellen Substanzen wurden von ca. 50 gescreenten Bakterienisolaten, zwei Isolate mit deutlichen antimikrobiellen Aktivitäten im Zellextrakt oder Überstandsextrakt gefunden. Andere Bakterienisolate mit nur schwachen antimikrobiellen Wirkungen wurden nicht weiter verfolgt. Am häufigsten konnte eine Wirkung gegen grampositive Bakterien (*B. megaterium*) detektiert werden. Weiterhin wurden auch Aktivitäten gegen das Wachstum der Alge *C. fusca* und des Pilzes *U. violacea* entdeckt. Eher selten wurde eine Inhibierung von *E. coli* nachgewiesen.

Die antimikrobiellen Aktivitäten im Rohextrakt führten zu Hemmhofdurchmessern zwischen 7 und 11 mm. Der größte erhaltene Hemmhofdurchmesser wurde von dem Rohextrakt von *Pseudomonas aeruginosa* mit 18 mm erhalten. Die daraus isolierte Substanz zeigt zwar gute antimikrobielle Eigenschaften, besitzt jedoch keine Aktivitäten, die als Therapeutikum interessant wären. Daher verbergen sich hinter den kleineren Hemmhofdurchmessern entweder Substanzen mit noch geringeren Aktivitäten (z. B. Fettsäuren), oder die aktiven Substanzen sind nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden oder es handelt sich um sehr unpolare Substanzen, die schlecht in den Agar diffundieren.

Ein Problem, das bei geringen antimikrobiellen Aktivitäten auftritt, ist die Detektion und Isolierung der wirksamen Substanzen. Selbst bei hoher Metabolitkonzentration ist es schwierig die aktive Substanz herauszufinden, daher muß mit großen Extraktmengen gearbeitet werden.

2. *Pseudomonas aeruginosa* aus dem Schwamm *Mycale tunicata*

Beim Screening nach biologisch aktiven Substanzen wurde aufgrund einer auffälligen antibakteriellen Wirkung der Extrakt eines Bakteriums untersucht, das aus dem Schwamm *Mycale tunicata* isoliert wurde. Der Mikroorganismus wurde als *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert. Aufgrund ihrer Anspruchslosigkeit sind Pseudomonaden überall, im Boden, im Wasser, Abwasser und in der Luft zu finden. *Ps. aeruginosa* ist ein aquatisches Bakterium, das als Opportunist auch den Menschen befallen kann und Mittelohrentzündungen, Wundinfektionen mit Eiterbildung bis hin zu Bakterienanämie verursachen kann [Madigan *et al.* 1997]. 1995 wurde aus dem antarktischen Schwamm *Isodictya setifera* ebenfalls *Pseudomonas aeruginosa* aufgrund seiner starken antibakteriellen Aktivitäten isoliert. Die Fraktionierung der Kulturbrühe brachte fünf bekannte und ein neues Diketopiperazin hervor. Weiterhin wurden zwei bekannte Phenanzin-Alkaloide isoliert. Die isolierten Substanzen besitzen inhibierende Wirkungen gegenüber grampositiven Bakterien [Jayatilake *et al.* 1995]. Anhand der in Abb. III.2 dargestellten Ergebnisse wurde die Annahme gemacht, daß das Bakterium mehrere verschiedene antimikrobelle Substanzen produziert. Aufgrund der Tatsache, daß es sich hierbei um die gleiche Species wie bei Jayatilake handelt, könnte es sich auch bei den nicht aufgeklärten Spots um die von ihm isolierten Metabolite handeln.

Zeitgleich mit der Stammidentifizierung wurde der Extrakt fraktioniert und eine der wirksamen Substanzen als ein Rhamnoselipid identifiziert. Die Struktur dieser Substanz wurde bereits ausgiebig diskutiert [Syldatk 1984], und stellt eines von vier verschiedenen Rhamnoselipiden dar. Das aus mariner Quelle isolierte Molekül entspricht der mit 67 % enthaltenen Hauptkomponente des Gemisches; diese wird mit Rhamnolipid 1 bezeichnet [Syldatk *et al.* 1985]. Weitgehende Untersuchungen über Produktion, Eigenschaften, Biosynthese und physikochemische Eigenschaften zu dieser Verbindung wurden bereits durchgeführt [Lang & Wullbrandt 1999, Arino *et al.* 1996], daher wurde in dieser Arbeit auf weitere Untersuchungen verzichtet.

Die antimikrobielle Wirkung des Rhamnoselipids ist mit einem IC_{50} von $27 \mu\text{g ml}^{-1}$ für grampositive Bakterien vergleichbar mit den Wirkungen anderer Biotenside z. B. Sophoroselipid [Lang *et al.* 1989]. Im Vergleich zu kommerziellen Antibiotika ist die Wirkung von Rhamnoselipid nicht so stark; der MHK-Wert für z.B. *S. aureus* ist 32 mal so hoch wie der von Tetracyclin und doppelt so hoch wie der von Chloramphenicol. Im Vergleich zu anderen marinen antimikrobiellen Substanzen, die in den letzten Jahren veröffentlicht wurden, besitzt Rhamnoselipid vergleichbare Aktivitäten (Kap. 3.2 Tab. IV.2).

3. *Pseudoalteromonas* spec. MH-Cr 6.3 aus dem Schwamm *Crella rosea*

3.1 Charakterisierung des Bakteriums

Bei dem isolierten Bakterium aus dem Schwamm *Crella rosea* wurde auf Basis von 1500 16 S rRNA Nukleotiden eine Ähnlichkeit von 99,8 % mit *Pseudoalteromonas piscicida* und von 99,7 % mit *Pseudoalteromonas* Y festgestellt. Die morphologischen Merkmale dieses Stammes entsprechen den in der Literatur für die Gattung *Pseudoalteromonas* beschriebenen. Die phenotypische Beschreibung der Gattung *Pseudoalteromonas* entspricht der Beschreibung in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [Baumann *et al.* 1984] und in The Prokaryotes [Gauthier & Breitmayer 1992] für die Gattung *Alteromonas*. Aufgrund einer erneuten phylogenetischen Analyse wurde 1995 von Gauthier eine Aufspaltung der Gattung *Alteromonas* in *Alteromonas* und *Pseudoalteromonas* gen. nov. vorgeschlagen. Zu *Pseudoalteromonas* gehören 12 verschiedene Species, die zum Teil als Produzenten verschiedener Pigmente und antimikrobieller Substanzen bekannt sind. Bei allen Species handelt es sich um typisch marine Bakterien, die Meerwasser für ihr Wachstum benötigen [Gauthier *et al.* 1995]. Die verschiedenen Species, die bisher bekannt sind, wurden aus dem Mittelmeer [Lemos *et al.* 1985], entlang der australischen Küste [Gravilovic *et al.* 1982] und in der Nähe von Japan [Nair & Simidu 1987] aus Seewasser [Gauthier 1976c], Sedimenten, Phytoplankton, Zooplankton und auch wie die in dieser Arbeit beschriebene Species aus Invertebraten [Shigemori *et al.* 1992, Stierle & Stierle 1992] isoliert.

Die Species *P. piscicida* wurde 1951 an der Südwestküste von Florida während eines Massensterbens von Fischen isoliert. Das 1954 von Bein beschriebene Bakterium wurde als *Flavobacterium piscicida* bezeichnet [Bein 1954]. Aufgrund der morphologischen und biochemischen Eigenschaften dieser Species erfolgte 1963 eine Umbenennung zu *Pseudomonas piscicida* Bein comb. nov. [Buck *et al.* 1963]. Die erst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte DNA-Analyse zeigte jedoch nur eine Übereinstimmung von 70 % zur Gattung *Pseudomonas* [Mandel *et al.* 1965]. Erst 1995 wurde diese Species der Gattung *Alteromonas*, später dann *Pseudoalteromonas* zugeordnet [Gauthier *et al.* 1995]. Das Bakterium wurde aufgrund seiner Toxizität gegenüber Fischen und Krabben als S2-Stamm eingestuft. Bei einem 1979 an der Mittelmeerküste isolierten Wildstamm konnte jedoch keine Fischtoxizität des Isolates, jedoch eine Wachstumsinhibierung durch den zellfreien

Kulturüberstand bei der Hefe *Rhodotorula* sp. nachgewiesen werden [Buck & Meyers 1966, Gauthier & Breitmayer 1979].

Der mit 99,7 % Übereinstimmung erst kürzlich entdeckte gelbe „*Pseudoalteromonas* Y“ besitzt wie auch MH-Cr 6.3 algizide Eigenschaften. Eine regulatorische Funktion durch positive als auch negative Beeinflussungen der Algenpopulation durch *Pseudoalteromonas* Y [Lovejoy *et al.* 1998] sowie durch *Pseudoalteromonas* spec. MH-Cr 6.3 sind naheliegend.

Die aus MH-Cr 6.3 isolierten antimikrobiellen Fettsäuren besitzen neben antibakteriellen und algiziden auch fungizide Eigenschaften gegenüber *U. violacea*. Das Bakterium aus dem Schwamm *Crella rosea* zeigt mit 99,8 % und mit 99,7 % eine sehr hohe Übereinstimmung mit den beschriebenen Species; für eine 100 %ige Identifizierung wäre jedoch die Durchführung einer DNA-Hybridisierung erforderlich. Der im Rahmen der Stammidentifizierung gefundene Unterschied zum ATCC 15057-Stamm in der Anzahl der Pigmente deutet auf einen möglichen Unterschied hin. Der Vergleich mit der Species *P. rubra* zeigt, daß selbst bei einer phylogenetischen Ähnlichkeit von 98,6 % die phenotypischen und biochemischen Merkmale zweier Stämme sehr ähnlich sein und nur die Art des Pigments und die untere Wachstumstemperaturgrenze Unterschiede aufweisen können (vgl. Tab. III.10).

Wie bei allen Species der Gattung *Pseudoalteromonas* handelt es sich auch bei dem Bakterium aus *Crella rosea* um ein gramnegatives, monopolar begeißeltes Stäbchen. Der Organismus ist in der Lage als Nährstoffreserve Speicherstoffe in den Zellen zu akkumulieren, die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennbar sind. Bei den meisten Mikroorganismen handelt es sich um Polyhydroxyalkanoate (PHAs), einer Klasse aliphatischer Polyester. Diese Speicherstoffe können von 25 % bis 80 % der Biotrockenmasse ausmachen. Die am häufigsten in der Natur vorkommende Verbindung ist die Polyhydroxybuttersäure [Weiner 1997]. Vermutlich handelt es sich bei MH-Cr 6.3 nicht um Polyhydroxybuttersäure, da bisher von keiner Species der Gattung *Pseudoalteromonas* bekannt ist, daß sie in der Lage ist diesen Speicherstoff zu akkumulieren [Gauthier *et al.* 1995, Baumann *et al.* 1984].

Der Vergleich des zellulären Fettsäureprofils verschiedener Species zeigt ein charakteristisches Fettsäuremuster dieser Gattung. Im Unterschied zu anderen Species ist der Anteil der Hydroxyfettsäuren bei MH-Cr 6.3 sehr hoch, der Anteil der gesättigten Fettsäuren dafür jedoch fast 10 % niedriger. Auffällig ist weiterhin der hohe Anteil der antimikrobiellen

C17:1-Fettsäuren bei MH-Cr 6.3, der mit 16 % um 93 % höher ist als bei anderen Species dieser Gattung (Tab. IV.1).

Tab. IV.1: Vergleich des Fettsäureprofils von *Pseudoalteromonas* spec. MH-Cr 6.3 mit den Daten für andere Species dieser Gattung [Svetashev *et al.* 1994].

	MH-Cr 6.3	Literaturdaten: [Svetashev <i>et al.</i> 1994]
gesättigte Fettsäuren	27,76 %	37,09 %
einfach ungesättigte Fettsäuren	60,89 %	60,90 %
Hydroxyfettsäuren	9,21 %	1,03 %

3.2 Charakterisierung der antimikrobiellen Substanzen

Marine Mikroorganismen stellen eine interessante Quelle ungewöhnlicher oder pharmakologisch aktiver Lipide dar. Aus *Methanococcus jannaschii* wurden ungewöhnliche makrocyclische terpenoide Membranlipide isoliert, die, wie sich später herausstellte, charakteristisch für Archea sind [Gambacorta *et al.* 1993]. Ein weiteres Beispiel ist das von dem Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* produzierte Curacin, das neben verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften auch antimitotische Wirkung besitzt [Gerwick *et al.* 1994]. Aus marinen Bakterien wurden weiterhin immunsuppressive Phospholipide isoliert, bei denen die üblichen Acylreste durch Isofettsäuren ersetzt sind [Kohama *et al.* 1996]. Den größten Teil der Halogenverbindungen marinen Ursprungs stellen die halogenierten Lipide dar. Aus schwammassoziierten Bakterien wurden verschiedene bromierte Fettsäuren isoliert [Brandley *et al.* 1995]. Eine Reihe aromatischer C16-Fettsäuren mit interessanten pharmakologischen Aktivitäten werden von dem von MH-Cr 6.3 nah verwandten marinen Bakterium *Pseudoalteromonas rubra* (damals *Alteromonas rubra*) produziert [Fenical & Jensen 1993]. Auch vergleichsweise einfache Verbindungen können interessante biologische Eigenschaften aufweisen. Aus einem marinen Weichtier wurde die doppelt ungesättigte C15-Fettsäure mit einer hohen Aktivität gegen grampositive Bakterien isoliert, deren Synthese wahrscheinlich durch das „symbiotische“ Bakterium *Eunicea succinea* erfolgt [Carballeira *et al.* 1997].

Aus den Zellen von MH-Cr 6.3 wurden zwei verschiedene ungesättigte Fettsäuren mit antimikrobieller Wirkung isoliert. Bei der Hauptkomponente handelt es sich um

Palmitoleinsäure (9c), die mit 39,39 % den höchsten Anteil der Fettsäurefraktion ausmacht. Die zweite bioaktive Substanz ist Heptadecensäure (9c) mit einem Anteil von 5,30 %. Bei den isolierten Substanzen handelt es sich nicht wie bei anderen Antibiotika um Sekundärmetabolite, sondern um Produkte des Primärstoffwechsels, da sie bereits in der exponentiellen Wachstumsphase bei Zunahme der Biomassekonzentration nachweisbar sind.

Fette oder Lipide sind einerseits wesentliche Bestandteile der Cytoplasmamembranen und Zellwände, andererseits dienen sie als Reservestoffe. In den bakteriellen Fetten überwiegen langkettige C14 bis C18 gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren. Das Auffinden von Fettsäuren mit ungerader Kohlenstoffanzahl ist selten und auf einige marine Organismen beschränkt. Die Fettsäurebiosynthese wird hauptsächlich durch selektive Primer-Moleküle geregelt, die das Fettsäuresynthetasesystem beeinflussen. Die Synthese von ungeradzahligen Fettsäuren wird durch Propionyl-CoA induziert. Anhand einer Manipulation der Acyl-Ketten-Primer bei der *de novo* Fettsäuresynthese eines marinen Bakteriums wurde gezeigt, daß [¹⁴C]Ser und [¹⁴C]Acetat nach Konvertierung zu Propionyl-CoA die Synthese ungeradzahliger Fettsäuren positiv beeinflussen [Nichols & Russell 1996]. Bei den Primern für die Synthese geradzahliger Fettsäuren handelt es sich insbesondere um Acetyl-CoA oder Butyryl-CoA. Untersuchungen am Beispiel der Fettsäuresynthese bei *E. coli* haben gezeigt, daß die gleichzeitige Synthese der C16:0, C16:1(c9) und C18:1(c11) Fettsäuren im wesentlichen durch drei Enzyme geregelt wird (Abb. IV.2). Die Konzentrationen der drei Fettsäuren werden durch die jeweiligen Enzymaktivitäten bestimmt [Harwood & Padley 1994]. Unter der Voraussetzung, daß bei MH-Cr 6.3 die gleichen Enzyme für die Regulation der Fettsäurebiosynthese verantwortlich sind, wie am Beispiel von *E. coli* gezeigt wurde, sollte hier eine hohe Enzymaktivität der 3-Ketoacyl-ACP-Synthetase I vorliegen, während die Aktivität der 3-Ketoacyl-ACP-Synthetase II eher niedrig ist. Die Konzentration von C18:1 (11c) beträgt nur etwa 30 % der Konzentration von C16:1 (9c).

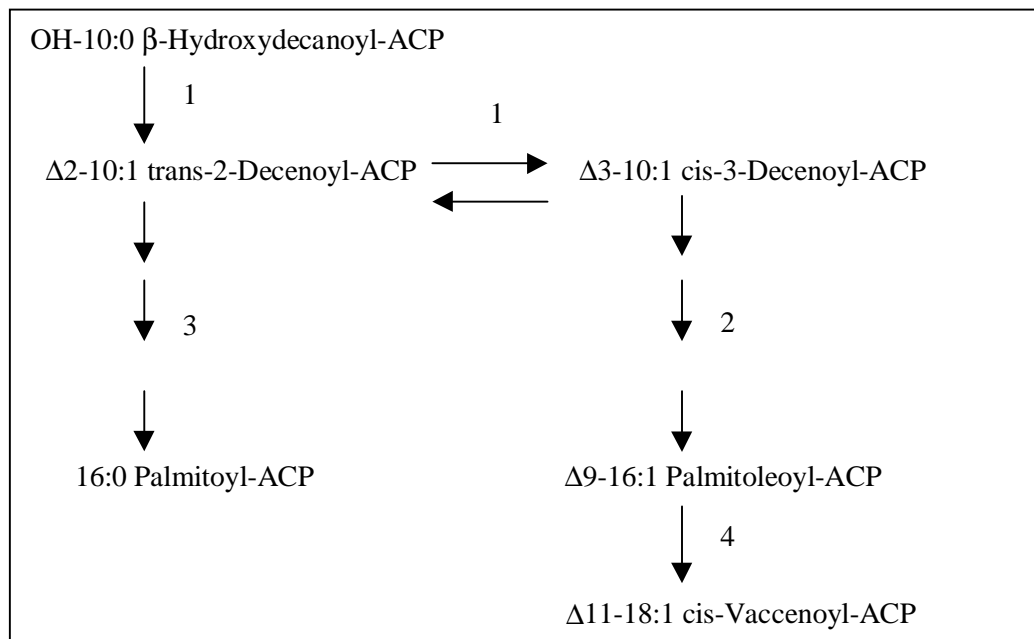


Abb. IV.2: Produktvielfalt bei der Fettsäurebiosynthese am Beispiel von *E. coli* [Harwood & Padley 1994].

1.) 3-Hydroxydecanoyl-ACP-Dehydratase; 2.) 3-Ketoacyl-ACP-Synthetase I;
3.) 3-Ketoacyl-ACP-Synthetase I und II; 4.) 3-Ketoacyl-ACP-Synthetase II

Einige Fettsäuren besitzen antimikrobielle Eigenschaften. Bei gesättigten Fettsäuren werden antimikrobielle Aktivitäten von C6:0 bis C14:0 gefunden, die mit zunehmender Kettenlänge und der damit korrelierenden Zunahme des lipophilen Charakters steigen [Kinderleder & Lund 1992, Freese *et al.* 1973, Hatton & Kinderlerer 1991]. Bei den gesättigten Fettsäuren mit Kettenlängen größer als C14 sind keine antimikrobiellen Aktivitäten vorhanden.

Am Beispiel von *B. subtilis* und *E. coli* wurde die Wirkungsweise verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren untersucht. Es wurde beobachtet, daß der Sauerstoffverbrauch der Zelle durch Fettsäuren inhibiert wird. Gesättigte Fettsäuren inhibieren den transmembranalen Transport verschiedener Substrate wie Aminosäuren, organische Säuren und Phosphat, was zu einer Entkopplung des Substrattransports vom Elektronentransportsystem führt. Die ungesättigten Fettsäuren inhibieren außerdem auch noch direkt den Elektronentransport [Freese *et al.* 1973]. Aufgrund dieser Wirkungsweise ist keine spezifische Wirkung gegen grampositive oder gramnegative Mikroorganismen vorhanden, sondern ein breites Wirkspektrum.

Der Vergleich der quantitativen antimikrobiellen Wirkungen der isolierten Substanzen mit verschiedenen marinen Wirkstoffen und kommerziellen Antibiotika ist in Tab. IV.2

zusammengefaßt. Die Aktivitäten (MHK-Werte) von Fettsäuren sind mit $512 \mu\text{g ml}^{-1}$ um ein bis zwei Zehner Potenzen niedriger als die Wirkungen anderer mariner Antibiotika. Eine für die Humantherapie interessante Substanz wie z.B. Tetracyclin besitzt sogar eine um den Faktor 500 höhere antibakterielle Aktivität als die isolierten Fettsäuren.

Aufgrund der eher schwachen antimikrobiellen Wirkung der isolierten Substanzen sind diese als Antibiotika zur Humantherapie uninteressant. Neben dem pharmakologischen Interesse gibt es jedoch andere Einsatzbereiche für antimikrobielle Fettsäuren. Ein sehr bedeutender Sektor ist die Lebensmittelindustrie, da hier hohe Anforderungen an Produktqualität und Haltbarkeit gestellt werden. Der Einsatz von antimikrobiellen Fettsäuren in Lebensmitteln ist besonders geeignet, da neben den keimabtötenden auch die physikalischen Eigenschaften dieser Substanzen ausgenutzt werden können. Aufgrund ihrer Struktur besitzen Fettsäuren z.T. auch emulgierende Eigenschaften und können auch als Kristallisationskeim eingesetzt werden. Das Lebensmittel ist bei der Vielzahl möglicher Kontaminationskeime am besten durch eine Substanz mit breitem Wirkspektrum vor mikrobiellem Verderb geschützt. Besonders interessant ist der Einsatz von antimikrobiellen Fettsäuren für die Margarine-, Eiscreme-, Kuchen-, Brot- und Keksherstellung. Eine Konservierung durch einen niedrigen pH-Wert, wie z.B. bei Butter und Käse, ist keine absolute Garantie für die Haltbarkeit eines Lebensmittels. Die Kontamination von Käse aus nicht pasteurisierter Milch durch *Listerien* stellt ein grundsätzliches Problem dar. Durch Zusatz von Hexansäure und Oktansäure zu dem Käse „Dänisch Blue“ wurde gezeigt, daß das Wachstum von *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* verhindert wird [Kinderlerer & Lund 1992].

Insbesondere in einer Zeit mit zunehmenden gesetzlichen Kontrollen und Hygienevorschriften, in der die Qualität aller Produkte strengen Kontrollen und einer immer größer werdenden Konkurrenz ausgesetzt ist, wird nach kostengünstigen Alternativen gesucht, die gute Produktqualitäten bieten. Vielleicht finden antimikrobielle Fettsäuren eines Tages in diesem Bereich häufiger Anwendung.

Neben der Lebensmittelindustrie stellt auch die Futtermittelindustrie ein mögliches Einsatzfeld für die isolierten Fettsäuren dar. Als Zusatz von Cremes, Lotionen und Deodorants wäre nicht nur die mikrobielle Qualität der kosmetischen Produkte verbessert, sondern die Fettsäuren könnten auch hier als Emulgator, Dispersionsmittel und Lösungsvermittler dienen. Die ständige Entwicklung neuer kosmetischer Produkte bietet ein breites Einsatzgebiet.

Tab. IV.2: Vergleich der minimalen Hemmkonzentrationen verschiedener Substanzen und Antibiotika.

Antibiotika	Herkunft	Testorganismus	IC ₅₀ -Wert [µg ml ⁻¹]	MHK-Wert [µg ml ⁻¹]
C16:1/C17:1 (9c)	MH-Cr 6.3 aus <i>Crella rosea</i>	<i>S. aureus</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>B. megaterium</i>	30 20 165	512 512 > 512
Rhamnoselipid	<i>Ps. aeruginosa</i> aus <i>Mycale tunicata</i>	<i>B. megaterium</i> <i>S. aureus</i>	27 27	64 32
Penicillin G	nach DIN 58940 Teil 5	<i>S. aureus</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>		0,063 IE ml ⁻¹ - -
Teracyclin		<i>S. aureus</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>		0,5 –1 - 2
Chloramphenicol		<i>S. aureus</i> <i>Ps. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>		16 - 8
Thiomarinol D,E,F und G ^{1.)}	marines Bakterium	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>		≤0,01 0,8-50
Epothilon ^{2.)}	Myxobakterium	<i>M. hiemalis</i>		20
Exophilin A ^{3.)}	mariner Pilz (<i>E. pisciphila</i>)	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>		50 > 100
Halymecin A ^{4.)}	mariner Pilz (<i>Fusarium sp.</i>)	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. vulgaris</i>		> 83 > 83 10
Marinone ^{5.)}	marines Bakterium	<i>B. subtilis</i>		1
(5Z,9Z)-14-Methyl-5,9-penta-decadiensäure ^{6.)}	marines Bakterium	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>Ps. aeruginosa</i>	36 - -	
C6:0		<i>P. crustosum</i> ^{*7.)}		3776
C8:0		<i>P. crustosum</i> ^{*7.)}		2884
C10:0		<i>P. crustosum</i> ^{*7.)}		1723
C11:0		<i>S. aureus</i> <i>P. crustosum</i> ^{*7.)}		1000 880
C12:0		<i>S. aureus</i>		500
C13:0		<i>S. aureus</i>		> 1000
<u>Monoglyceride:</u>				
MG C11:0		<i>S. aureus</i>		500
MG C12:0		<i>S. aureus</i>		250
MG C13:0		<i>S. aureus</i>		> 1000

* *Penicillium crustosum*1.) Shiozawa *et al.* 19972.) Gerth *et al.* 19963.) Doshida *et al.* 19964.) Chen *et al.* 19965.) Pathirana *et al.* 19926.) Carballeira *et al.* 1997

7.) Hatton & Kinderlerer 1991

Wie aus Tab. IV.2 hervorgeht kann die antimikrobielle Aktivität bei einigen Fettsäuren durch Überführung in die korrespondierenden Monoglycerinester gesteigert werden. Eine chemische Reaktion oder eine enzymatische Katalyse (Lipase) der isolierten Fettsäuren zu einem Molekül mit stärkerer Wirkung bietet weitere Einsatzmöglichkeiten. Diese nichtionischen Tenside werden aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften bereits vielfach in der Industrie eingesetzt [Mouloungui *et al.* 1998].

Neben den antimikrobiellen Eigenschaften besitzen die isolierten Fettsäuren auch algizide Wirkung. Bei mehreren marinen Bakterien wurde diese Eigenschaft bereits beobachtet, und auf eine regulatorische Funktion der Bakterien im marinen Lebensraum zurückgeführt. Die Lyse der Algen durch Bakterien ist ein wichtiger Faktor zur Wachstumskontrolle der Algen [Kato *et al.* 1998, Imai *et al.* 1995] und kann sowohl durch extrazelluläre Produkte als auch durch Zellkontaktmechanismen induziert werden. Im Gegensatz zu der Ausschleusung extrazellulärer Produkte bei *Pseudoalteromonas* Y [Lovejoy *et al.* 1998] wird die algizide Wirkung von MH-Cr 6.3 durch Zellkontaktmechanismen entstehen, da die algiziden Fettsäuren Bestandteil der Zellmembran sind. Aus der Kulturbrühe von *Fusarium* sp., der von einer marinen Alge isoliert wurde, konnten Halymecin A, B, und C isoliert werden. Neben antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften besitzen diese Polyhydroxyester-Verbindungen algizide Wirkungen mit MHK's zwischen 4 und 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$ für verschiedene Algen Species [Chen *et al.* 1996].

Im Rahmen der Antitumor-Untersuchungen der KTB Tumorforschung GmbH in Freiburg wurden inhibierende Eigenschaften der aktiven Fettsäurefraktion gegenüber drei verschiedenen Proteinkinasen festgestellt. Die Beteiligung von Proteinkinasen an der Tumorentwicklung erfolgt über verschiedene molekulare Mechanismen. Die Proteinkinase CDK2 ist an der Regulation des Zellzyklus (Wachstum und Teilung) beteiligt. Die Tyrosinkinase des Rezeptors für den *Epidermal Growth Factor* (EGF-R-TK) ist in verschiedenen Tumoren überexprimiert und dient daher als Zielstruktur für die Entwicklung von Tumor-Therapeutika. Die Proteinkinase C, Subtyp e (PKC-e) ist ein intrazellulärer Rezeptor für verschiedene tumorpromovierende Chemikalien, wie z. B. Phorbolester-Derivate. Sie dient daher als Target für die Entwicklung von Tumor-Therapeutika. Für die Entwicklung eines spezifischen Kinase-Hemmstoffes werden vor allem potente Kinase-Inhibitoren gesucht, die mit hoher Selektivität eine (oder eine kleine Gruppe von zwei bis drei) spezifische Kinase hemmen. Da es sich bei den Ergebnissen der Proteinkinasetests nur

um Einfachbestimmungen handelt, müssen die Ergebnisse zunächst noch einmal bestätigt werden, bevor weitere Tests (Zellkulturen und Tierversuche) über die Eignung der Substanz als Kinase-Hemmstoff entscheiden.

3.3 Charakterisierung weiterer Metabolite

Nukleoside

Wie die Ergebnisse zeigen produziert MH-Cr 6.3 neben verschiedenen Fettsäuren und Pigmenten in größeren Mengen die Nukleoside Adenosin und Uridin. Frühere Untersuchungen von Enei haben gezeigt, daß die Produktion von Adenosin immer dann erfolgt, wenn die Enzyme IMP-Dehydrogenase und AMP-Deaminase fehlen oder nur in sehr geringer Konzentration vorhanden sind. Außerdem muß die Enzymkonzentration der Nukleosidasen und Nukleosidphosphorylasen, die zu einer Degradation des Nukleosids führen, sehr niedrig sein. Ein weiterer einflußreicher Punkt ist die Purinnukleosidkonzentration in der Zelle. Purinnukleoside besitzen als Rückkopplungsinhibitor regulatorische Funktionen bei der Purinnukleotidbiosynthese [Enei 1988].

Die Produktion von Adenosin durch Mikroorganismen wurde erstmal 1968 von Konishi *et al.* für *B. subtilis* beschrieben. In späteren Arbeiten wurde von verschiedenen Mutanten Inosinproduzierender *Bacillus*-Stämme berichtet, die Adenosin akkumulieren [Kuninaka 1996]. Bei der industriellen Produktion von Adenosin durch *B. subtilis* konnten aus 80 g l⁻¹ Glukose in 104 h 9 g l⁻¹ Adenosin gewonnen werden [Nishiyama *et al.* 1993]. Im Vergleich dazu liegt die Adenosinkonzentration im Zellextrakt von MH-Cr 6.3 bei weniger als 270 mg l⁻¹ in MB-Medium und kleiner als 400 mg l⁻¹ in optimierten Medium. Eine Induktion der Adenosinproduktion bei MH-Cr 6.3 durch Glukose als Substrat kann ausgeschlossen werden, da auch in MB-Medium ohne Glukosezusatz die Produktion stattfindet. Vier verschiedene Verfahren zur Gewinnung von Adenosin mit *Bacillus species*, *Corynebacterium glutamicum* oder *Brevibacterium ammoniagenes* wurden seit 1985 patentiert [Kuninaka 1996].

Im Verhältnis zur Adenosinkonzentration im Zellextrakt von MH-Cr 6.3 ist die Konzentration von Uridin bei qualitativem Vergleich auf der DC viel niedriger. Die Produktion von Uridin erfolgt bei Störungen der Pyrimidinnukleotidbiosynthese und bei fehlender Uridin-

phosphorylase-Aktivität. Es wurden verschiedene Stämme gefunden, die zwischen 10 und 55 mg ml⁻¹ Uridin akkumulieren. In den meisten Fällen handelt es sich um Mutanten einer *Bacillus* Species. Für verschiedene Stämme von *Bacillus subtilis* und *Mikrobacterium lacticum* wurden seit 1989 Verfahren zur Produktion von Uridin patentiert [Kuninaka 1996].

Nukleoside können als Ausgangsstoffe für die Synthese verschiedener antitumoraler und antiviraler Substanzen verwendet werden. Weiterhin gibt es mehr als 100 natürliche Antibiotika, die Purin- oder Pyrimidin enthalten [Suzuki 1984, Barth 1997]. Die Synthese neuer Substanzen mit Nukleosidbausteinen ist eine Herausforderung für den präparativen organischen Chemiker.

Desoxyribonukleotide entstehen durch Reduktion der Ribonukleotide. Daher wird auch die Akkumulation der Desoxynukleoside vermutlich durch Störungen der Pyrimidinnukleotidbiosynthese und Purinnukleotidbiosynthese entstehen. Zu den Nukleosiden Adenosin und Uridin sind im Zellextrakt auch die RNA äquivalenten Desoxyribonukleoside (Desoxyadenosin und Desoxythymidin) vorhanden, nach qualitativer Einschätzung jedoch in geringerer Konzentration.

β-Hydroxyfettsäuren

Die β-Hydroxyfettsäuren (C16:0 und C18:1), die aus dem Zellextrakt isoliert werden konnten, entsprechen nicht den Fettsäuren, die im Rahmen der Ermittlung des Fettsäureprofils von MH-Cr 6.3 gefunden wurden. β-Hydroxyfettsäuren entstehen als Intermediate der Fettsäurebiosynthese (D-3-OH) und während der β-Oxidation (L-3-OH) [Passeri *et al.* 1992, Hommel & Ratledge 1993]. Bei der Bioreaktorkultivierung mit optimiertem Medium konnte qualitativ gezeigt werden, daß sie dort nur als Zwischenprodukt auftreten. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zur Bildung der Speicherstoffe, bei denen es sich vermutlich um Polyalkanoate handelt.

Pigmente

Zahlreiche Bakterien fallen durch eine ausgeprägte Färbung auf. Die Fähigkeit Farbstoffe zu bilden, ist genetisch fixiert und hat somit Merkmalcharakter. Bei den Farbstoffen kann es sich um Derivate verschiedener Stoffklassen handeln: Carotinoide, Phenazinfarbstoffe, Pyrrol-

farbstoffe, Azachinone, Anthrocyane und andere. Die Pigmente der Mikroorganismen sind Sekundärmetabolite. Einige Pigmente besitzen antibiotische Eigenschaften und viele pigmentierte Mikroorganismen sind Antibiotikabildner. Die Korrelation ist sehr eng, so daß mit hoher Wahrscheinlichkeit bei einem Pigmentbildner auch Antibiotika oder andere Wirkstoffe gefunden werden [Schlegel 1992].

Der Stamm MH-Cr 6.3 produziert mindestens zwei nicht-carotinoide gelbe Pigmente, die stark an eine unbekannte Substanz, bei der es sich vermutlich um Protein handelt, adsorbiert sind. Die Strukturaufklärung dieser Substanz ist trotz intensiver Bemühungen bisher noch nicht gelungen. Im Rahmen der Ursachenforschung des Fischsterbens vor Florida wurde sogar vermutet, daß es sich bei dem Farbstoff von *P. piscicida* ATCC 15057 um das gesuchte Fischtoxin handelt [Bein 1954]. Anhand des Vergleiches des Zellextraktes von *P. piscicida* ATCC 15057 und dem aus *C. rosea* isolierten Stamm wurde gezeigt, daß die gelben Pigmente von MH-Cr 6.3 auch von dem ATCC-Stamm produziert werden. Im Zellextrakt dieses Stammes ist jedoch noch ein weiterer Spot zu beobachten. Die Möglichkeit, daß es sich bei allen Spots um den gleichen Farbstoff handelt, der nur an verschiedene Proteinfragmente gebunden ist, kann nahezu ausgeschlossen werden, da unabhängig vom Trägermaterial und Laufmittel immer mehrere Spots oder Peaks in den Spektren beobachtet wurden. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein Isomerengemisch. Während des Wachstums von *P. piscicida* und MH-Cr 6.3 in MB-Medium wurden unterschiedliche Verfärbungen der Kulturbrühen beobachtet. Die Vermutung, daß es sich bei dem Farbstoff um ein Pipteridinderivat handelt kann unter der Annahme, daß eine Adsorption des Farbstoffes an Peptide stattfindet, aus den aufgenommenen Spektren und den von Hansen [Hansen *et al.* 1964] veröffentlichten Daten nicht bewiesen werden. Daher bleibt selbst die Substanzklasse weiterhin ungeklärt.

In der Literatur wird häufig von gelben und orangen Substanzen aus marinen Bakterien berichtet. In vielen Fällen handelt es sich um unpolare Substanzen, die carotinoid-ähnliche Strukturen besitzen. In einem Screening nach marinen, mikrobiellen, carotinoiden Naturstoffen wurden aus Seewasser, Sedimenten und Invertebraten 400 Bakterienisolate gewonnen, von denen 7,3 % gelb, orange oder rote Kolonien bilden [Yokoyama & Miki 1994]. Die Produktion von nicht carotinoiden Pigmenten wird bei Species der Gattung *Pseudoalteromonas* häufig beobachtet. *Alteromonas citrea* (heute: *Pseudoalteromonas*) produziert mehrere zitronengelbe Pigmente, die im Chloroform/Methanol-Gemisch ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 438 nm besitzen [Gauthier 1977]. Eine andere Species, *Alteromonas aurantia*, bildet orange nicht-carotinoide Pigmente, deren

Lösung ein Absorptionsmaximum bei 396 nm besitzt [Gauthier & Breittmayer 1979]. Selbst *Pseudoalteromonas luteoviolaceus*, der durch die Produktion des violetten Farbstoffes Violacein auffällt, bildet außerdem noch einen gelben nicht-carotinoiden Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 400 nm [Gauthier 1975]. Das UV-Maximum des Farbstoffes von MH-Cr 6.3 liegt mit 379 nm ähnlich wie die der Pigmente der anderen gelben Bakterien. In allen UV-Spektren ist ein zweites Maximum bei 280 nm erkennbar, was auf Proteinbestandteile hinweist. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von MH-Cr 6.3 in wässriger Lösung bei pH 11 liegt im UV-Spektrum bei der gleichen Wellenlänge wie das Maximum bei dem Farbstoff von Hansen. Im sauren Bereich ist jedoch ein Unterschied von etwa 20 nm zu beobachten.

Die Ergebnisse aus Kap. 4.2.2 haben gezeigt, daß die Farbstoffproduktion bei MH-Cr 6.3 durch Zusatz von Saccharose als Substrat gesteigert wird. Im Gegensatz zu *P. aurantia*, *P. citrea* und auch dem nah verwandten Stamm *P. rubra* ist durch Zusatz von Stärke oder Glycerin zu MB-Medium bei MH-Cr 6.3 keine Steigerung der Produktion zu beobachten [Gauthier 1976a].

3.4 Wachstum und Metabolismus von MH-Cr 6.3

Salzkonzentration

Der Stamm MH-Cr 6.3 wurde im Rahmen des Screenings von Marine Broth-Agar isoliert. Es handelt sich hier um ein typisch marines Bakterium, das Na^+ zum Wachstum benötigt. Bei marinen Bakterien liegt der Na^+ -Bedarf im allgemeinen zwischen 70 und 300 mM. Die Anwesenheit von Natrium ist essentiell für bestimmte Enzyme, die an der Oxidation verschiedener exogener Substrate beteiligt sind. Außerdem ist Natrium für die Aufnahme von Aminosäuren, Tricarbonsäuren, Galaktose, cyclische Intermediate, Orthophosphat und K^+ durch die Zellwand erforderlich [Baumann & Baumann 1981, Gauthier & Breittmayer 1992]. Optimales Wachstum erfolgt bei MH-Cr 6.3 im Konzentrationsbereich von 70 – 500 mM Na^+ . Somit ist MB-Medium mit 333 mM Na^+ in Bezug auf die Salzkonzentration für das Wachstum von MH-Cr 6.3 gut geeignet, während in NB-Medium kein Wachstum stattfindet. Für den nah verwandten Stamm *Pseudoalteromonas rubra* liegt die Na^+ -Konzentration für optimales Wachstum bei 400 mM [Gauthier 1976a].

C-Quellen

Neben verschiedenen Aminosäuren verwertet MH-Cr 6.3 auch einige Zucker. Das beste Wachstum wird bei Verwendung von Glukose als C-Quelle erreicht. Lediglich bei der Verwertung von Glukose ist ein pH-Abfall im Medium zu beobachten. Der Glukoseabbau erfolgt bei *Pseudoalteromonas* nicht wie bei den meisten Lebewesen über den Embden-Meyerhof-Weg, sondern über den für *Pseudomonaden* typischen und auf einige Bakterien begrenzten Entner-Doudoroff-Abbauweg [Baumann & Baumann 1981]. Bei dem marinen Bakterium *Shewanella colwelliana* wurde sogar für die Metabolisierung von Glukose eine Kombiantion des Hexose-Monophosphat- und des Entner-Doudoroff Abbauweges beschrieben [Abu *et al.* 1994]. Als Endprodukt dieses Stoffwechselweges entsteht auch hierbei Pyruvat. Da MH-Cr 6.3 nicht in der Lage ist, unter anaeroben Bedingungen zu wachsen und Laktat zu bilden, ist der pH-Abfall möglicherweise auf eine Ausschleusung von Pyruvat, einer anderen organischen Säure des Citratcyclus oder einer verstärkten CO₂-Produktion zurückzuführen. Im Rahmen der Prozeßoptimierung konnte gezeigt werden, daß die spezifische Glukoseverbrauchsrate temperaturabhängig ist. Bei 37°C ist die spezifische Glukoseverbrauchsrate doppelt so hoch wie bei 27 °C, es wird jedoch nur 50 % der maximalen Biomassekonzentration erreicht.

Bei der Verwertung anderer Zucker wie Saccharose, Fruktose und auch Stärke bleibt der pH-Wert etwa bei dem Ausgangswert von 7,6. Bei der Verwertung von Aminosäuren ist ein deutlicher pH-Anstieg von 7,6 auf bis zu 8,6 zu beobachten, obwohl nur ein geringer Teil (3 %) des Aminosäurestickstoffes nicht als N-Quelle verwertet wird und in Form von NH₄⁺ bzw. NH₃ als Produkt der oxidativen Desaminierung freigesetzt wird. Die vom Organismus aufgenommenen Aminosäuren werden entweder in die Zellproteine eingebaut oder auf speziellen Stoffwechselwegen schließlich desaminiert, in den Intermediärstoffwechsel eingeschleust und endoxidiert. Sie dienen dann als Energiequelle und werden über den Citratcyclus abgebaut (Abb. IV.3).

Der komplexe Mediumsbestandteil Pepton besteht etwa zu 30 % aus freien Aminosäuren, weiterhin enthält das Medium Hefeextrakt, der neben Vitaminen und verschiedenen Zuckern ebenfalls freie Aminosäuren enthält. Wie die Ergebnisse aus den Bioreaktorkultivierungen gezeigt haben, werden von den zur Verfügung stehenden Aminosäuren bevorzugt die glucogenen Aminosäuren Arginin, Asparagin und die beiden Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin verwertet. Asparagin wird von der Asparaginase zu NH₄⁺ und Aspartat hydrolysiert, das dann anschließend transaminiert wird. Die Aminosäure Arginin wird über Glutamat-γ-

semialdehyd zu Glutamat oxidiert und kann direkt in den Citratcyclus eingeschleust werden. Die α -Aminogruppen des Serins und des Threonins können direkt in NH_4^+ umgewandelt werden. Diese direkte Desaminierung, die durch eine Dehydratase katalysiert wird, ergibt als Produkt Aminoacrylat, das sofort mit H_2O zu Pyruvat und NH_4^+ reagiert.

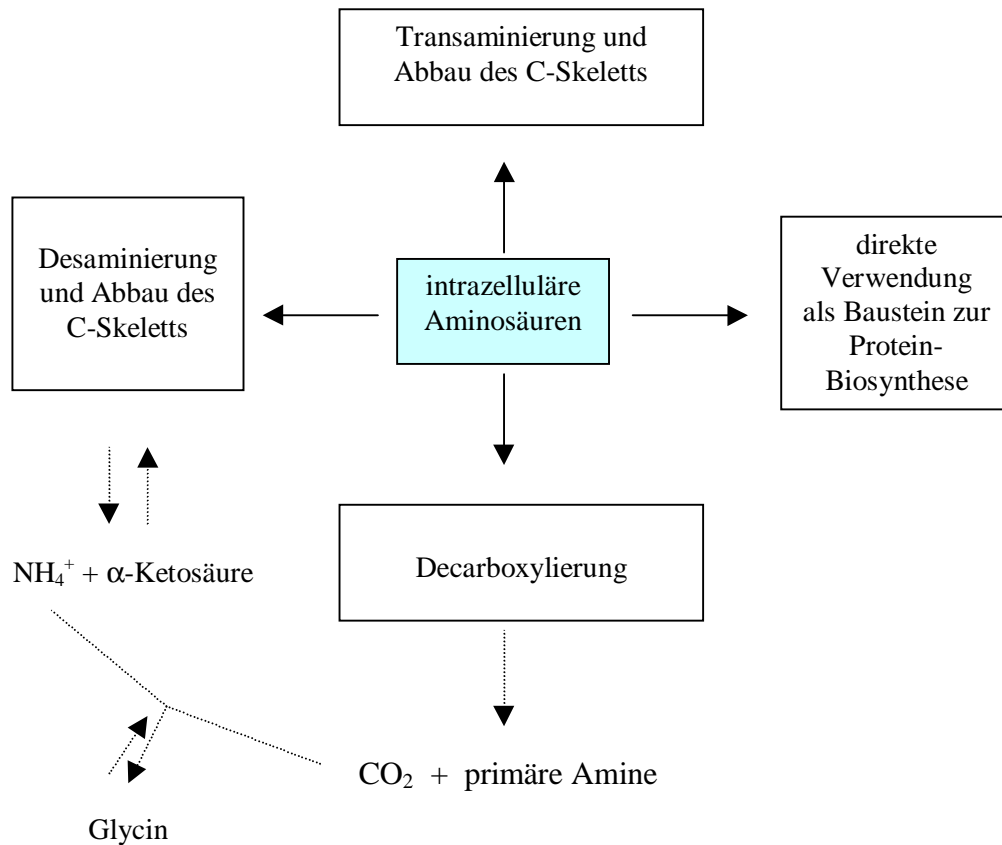


Abb. IV.3: Mögliche Stoffwechselschritte bei der Metabolisierung von Aminosäuren.

Bei jeder Kultivierung von MH-Cr 6.3 ist in der exponentiellen Wachstumsphase ein Anstieg der Glycinkonzentration zu beobachten. Beim Übergang in die stationäre Phase wird Glycin wieder vollständig verbraucht. Glycin wird aus Kohlendioxid und Ammoniak mit Hilfe der Glycin-Synthetase, einem Pyridoxalphosphat-Enzym, synthetisiert. Außerdem entsteht Glycin aus L-Serin durch die Serin-Hydroxymethyltransferase, die den Transfer des β -Kohlenstoffatoms der Serinseitenkette zum Tetrahydrofolat katalysiert, was auch den hohen Verbrauch von Serin in der exponentiellen Phase erklären würde. Der spätere Abbau von Glycin kann wieder zurück über Serin zu Pyruvat erfolgen, so daß Glycin zur Energiegewinnung verwendet wird. Da jedoch für die Purinbiosynthese Glycin als Vorstufe benötigt wird und die Produktion der Nukleotide in MH-Cr 6.3 aufgrund der Akkumulation von Nukleosiden sehr

hoch sein sollte, liegt die Vermutung nahe, daß diese Aminosäure direkt in die Purinbiosynthese eingeht.

In allen Aminosäureabbauschritten wird $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ frei, das entweder ausgeschleust wird oder mit Hilfe entsprechender Enzyme wieder an eine Kohlenstoffverbindung addiert wird und dem Aufbau neuer Aminosäuren (z.B. Glycin) dient [Stryer 1995, Lehninger 1987, Schlegel 1992].

N-Quellen

Das Bakterium MH-Cr 6.3 verwertet die im Medium enthaltenen freien Aminosäuren sowohl als C- als auch als N-Quelle. Die Ergebnisse haben gezeigt, daß andere Substrate als N-Quelle nicht geeignet sind und sogar einen inhibierenden bis toxischen Einfluß auf das Wachstum von MH-Cr 6.3 besitzen. Harnstoff wird als N-Quelle nicht verwertet, da der Organismus keine Urease zur Metabolisierung des Substrates besitzt. Durch eine extrazelluläre Harnstoffkonzentration von 2 g l^{-1} wird der Organismus vollständig abgetötet. Nitrat als N-Quelle wird nur von einer Species der Gattung *Pseudoalteromonas*, von *P. denitrificans* verwertet [Gauthier 1995]. Stämme einiger Species wachsen in Medien mit einfachen C-Quellen und NH_4Cl als N-Quelle. Von verschiedenen Stämmen ist jedoch bekannt, daß sie Aminosäuren in Konzentrationen von mindestens 1 mg l^{-1} zum Wachstum benötigen [Baumann *et al.* 1984].

Sauerstoff

MH-Cr 6.3 wächst ausschließlich unter aeroben Bedingungen. Der durch die Zelle aufgenommene Sauerstoff wird für die Energiegewinnung, für Synthesereaktionen, für den Zellmassenaufbau und den Erhaltungsstoffwechsel benötigt. Sauerstoff ist der terminale Elektronen-Akzeptor der aeroben Atmung und somit essentiell für MH-Cr 6.3. Die im Rahmen der Wachstumsoptimierung durchgeführten Untersuchungen zur Begasungsrate haben gezeigt, daß bei zu geringer Sauerstoffversorgung das Wachstum des Organismus schlechter ist. Zum ungehinderten Wachstum benötigen aerobe Mikroorganismen eine minimale Sauerstoffkonzentration (kritische Sauerstoffkonzentration). Die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser ist sehr gering und von den Mediumsbestandteilen abhängig. Bei einzelligen Organismen ist der Sauerstoffübergang aus der Luftblase in das flüssige Medium der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im Gesamtprozeß. Durch kontinuierliche

Sauerstoffzufuhr während der Kultivierung, sollte eine ausreichende Sauerstoffversorgung aufrechterhalten werden. Übersteigt der Sauerstoffverbrauch durch die Zellen die Nachlieferung, so erreicht die Lösungsgeschwindigkeit des Sauerstoffes einen Maximalwert [Ward 1994, Muttzall 1994]. Bei einer Begasungsrate von 0,1 v/vm in MB-Medium mit 5 g l⁻¹ Glukose und 5 g l⁻¹ Pepton ist der Maximalwert der Lösungsgeschwindigkeit von Sauerstoff erreicht, jedoch nicht die kritische Sauerstoffkonzentration von MH-Cr 6.3 für ungehindertes Wachstum.

Bei Kultivierungen im Schüttelkolben wird eine sehr schlechte Sauerstoffversorgung erreicht, da nur eine begrenzte Diffusion von Sauerstoff durch den Wattestopfen möglich ist. Bei sehr hoher Umdrehungszahl kann im Schüttelkolben maximal ein Viertel der im Bioreaktor möglichen Sauerstofftransportrate erreicht werden. Der Wechsel des Kultivierungsgefäßes vom Schüttelkolben zum Bioreaktor bei MH-Cr 6.3 führte zu einer Steigerung der Biomassekonzentration um 16,7 %. Da außer einer pH-Regelung, die nur für den Ausgleich eines geringen pH-Anstieges erforderlich war, gleiche Bedingungen im Schüttelkolben und Bioreaktor existierten, ist der Biomasseanstieg auf die bessere Durchmischung und der daraus resultierenden verbesserten Sauerstoffversorgung zurückzuführen.

Im Rahmen der Begasungsratenoptimierung hat sich weiterhin gezeigt, daß bei einer zu hohen Begasungsrate das Wachstum von MH-Cr 6.3 inhibiert wird. Bei hoher Sauerstoffzufuhr entstehen in Anwesenheit von Flavoproteinen oder Eisen-Schwefelproteinen und Oxidasen Reduktionsprodukte des Sauerstoffes, die in der Zelle akkumuliert werden. Bei den Verbindungen von reduziertem Sauerstoff handelt es sich um H₂O₂ oder dem noch toxischeren Superoxidradikal O₂^{•-}. Diese Moleküle wirken toxisch auf die Zellen und können zu Produktoxidationen führen. Der Stamm besitzt zwar die Enzyme Cytochromoxidase und Katalase, die eine Schutzwirkung gegenüber den toxischen Sauerstoffprodukten entfalten, doch diese Kapazitäten scheinen bei hohem Sauerstoffeintrag nicht auszureichen. Cytochrom-Oxidase ist das terminale Enzym der Elektronentransportkette und katalysiert die gleichzeitige Übertragung von vier Elektronen auf Sauerstoff unter Bildung von zwei O²⁻-Ionen, die mit zwei Protonen zur Bildung von Wasser führen. Das zweite Enzym, das eine Schutzfunktion entfaltet, ist die Katalase. Dieses Enzym reduziert das durch andere Reaktionen entstehende zelltoxische H₂O₂ wieder zu Wasser [Gottschalk 1986, Schlegel 1992].

Die optimale Sauerstoffversorgung für schnelles Wachstum und eine hohe Biomasseproduktion von MH-Cr 6.3 in MB-Medium mit Glukose- und Peptonzusatz wird bei den Begasungsraten 0,2 und 0,3 v/vm erreicht.

Wachstum

Das Wachstum von MH-Cr 6.3 konnte während der Bioreaktorkultivierung besser charakterisiert werden als bei Schüttelkolbenkultivierungen. Neben der Möglichkeit online-Messungen vom pH-Wert, der Gelöstsauerstoffkonzentration im Medium, der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidbildungsrate durchzuführen, bestand weiterhin die Möglichkeit regelmäßig (alle 1,5 h) größere Probenvolumina (250 ml) zu entnehmen, um die Menge und den Zeitpunkt der Wirkstoffproduktion zu ermitteln. Bereits während des exponentiellen Wachstums erfolgt die Produktion der antimikrobiellen Fettsäuren im direkten Zusammenhang mit der Zunahme der Biomassekonzentration, da sie ein Bestandteil der Zellwand sind. Aufgrund der guten Korrelation von Biomassezunahme, OD-Verlauf und Zellproteinkonzentration sind alle drei Parameter als charakteristische Wachstumsgrößen geeignet. Die Zellproteinkonzentration liegt mit ca. 20 % der Biotrockenmasse im Vergleich zu anderen Mikroorganismen, bei denen die Proteinkonzentration bei 50 % liegt [Madigan *et al.* 1997], sehr niedrig. Da MH-Cr 6.3 jedoch Speicherstoffe in der Zelle akkumuliert, sinkt der prozentuale Anteil der Zellproteinkonzentration an der Biotrockenmassekonzentration. Im Vergleich zu anderen marinen Bakterien, die im Rahmen dieses Screenings kultiviert wurden, wächst MH-Cr 6.3 in MB-Medium-Flüssigkultur sehr schnell, erreicht schon nach 22 h die maximale Zelldichte und geht anschließend gleich in die Absterbephase über. Eine relativ kurze exponentielle Wachstumsphase wie sie bei MH-Cr 6.3 zu finden ist, zeigt auch *P. antarctica*. Dieser Stamm erreicht bereits nach ca. 10 h die stationäre Phase und geht nach ca. 42 h bei einer relativ niedrigen optischen Dichte von 1,7 in die Absterbephase über [Vera *et al.* 1998].

Während des Wachstums von MH-Cr 6.3 in MB-Medium im 50 l Bioreaktor ist eine Diauxie zu beobachten. Dieses Phänomen spiegelt die Wirkung der verschiedenen Substrate auf die Enzyymbildung wieder. Das zuerst verwertete Substrat induziert die zu seiner Verwertung erforderlichen Enzyme und reprimiert gleichzeitig die Synthese der anderen Enzyme. Für *E. coli* wurde eine Diauxie bei Anwesenheit von Glukose mit Sorbit, Laktose oder Acetat beschrieben. In allen Fällen erwies sich Glukose als Repressor der anderen benötigten Enzyme [Madigan *et al.* 1997]. Wird eine Aminosäure gleichzeitig wie bei MH-Cr 6.3 als

Energie- und Kohlenstoffquelle sowie als Stickstoffquelle verwertet, so gestaltet sich der Zusammenhang komplizierter. Untersuchungen zum Einfluß von Glukose auf die Histidinverwertung bei *Enterobacter aerogenes* haben gezeigt, daß Stickstoffmangel die durch Glukose bewirkte Katabolit-Repression teilweise aufhebt [Schlegel 1992]. Eine Katabolit-Repression kann auch durch andere Substrate als Glukose erzeugt werden. Da MB-Medium ein Gemisch aus komplexen Bestandteilen enthält, ist es besonders schwierig, Aussagen bezüglich dieser Wechselwirkungen zu machen. Die Vielzahl der Bioreaktorkultivierungen und den dazugehörigen Aminosäurekonzentrationsbestimmungen läßt zumindest die Aussage zu, daß bevorzugt und als erstes Arginin, Asparagin, Serin und Threonin verbraucht werden und zuletzt die Aminosäuren Valin, Glutaminsäure, und Glycin. Da in reinem MB-Medium keine Glukose enthalten ist, müssen hier andere Substrate für die beobachtete Diauxie verantwortlich sein. Möglicherweise spielt auch hier wie bei der Histidinverwertung von *E. aerogenes* eine Limitierung des Aminostickstoffes eine entscheidende Rolle für den Beginn der zweiten Phase.

3.5 Optimierung des Wachstums und der Wirkstoffproduktion

Mediumsoptimierung

Mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zur Verwertung verschiedener C- und N-Quellen wurde das Medium Marine Broth in Bezug auf schnelleres Wachstum und höhere Biomasseproduktion optimiert. Da die komplexen Mediumsbestandteile Hefeextrakt und Bacto Pepton neben dem hohen Anteil an freien Aminosäuren auch reich an Vitaminen und Spurenelementen sind, wurde die optimale Konzentration und das beste Verhältnis dieser beiden komplexen Bestandteile für das Wachstum von MH-Cr 6.3 ermittelt. Bei einer Steigerung der optimalen Konzentrationen (30 g l⁻¹ Hefeextrakt, 5 g l⁻¹ Pepton) um 5 g l⁻¹ Pepton waren bereits Überfütterungseffekte zu beobachten. Für *Alteromonas putrefaciens* wurde ein Überfütterungseffekt bei einem Gemisch von 20 g l⁻¹ Pepton und 10 g l⁻¹ Hefeextrakt beobachtet [Hibino *et al.* 1993].

Durch Zusatz von 5 g l⁻¹ Glukose konnte das Wachstum nochmals gesteigert werden, wobei auch hier bei höheren Konzentrationen wieder ein deutlich schlechteres Bakterienwachstum beobachtet wurde. Untersuchungen anderer Species der Gattung *Pseudoalteromonas* zeigten ebenfalls, daß D-Glukose als Substrat verwertet wird, jedoch als alleinige Kohlenstoff- und

Energiequelle nicht ausreicht. Eine Kombination von Substraten hat sich für das Wachstum bei allen Stämme als erforderlich erwiesen [Baumann *et al.* 1984]. Die Optimierungsversuche wurden in Schüttelkolben durchgeführt, da somit parallele Untersuchungen mehrerer Ansätze zu aussagekräftigeren Ergebnissen führten. Andererseits gibt es bei Schüttelkolbenkultivierungen aufgrund der mangelnden pH-Konstanz durch unregelmäßigen Verlauf und uneinheitlichem Sauerstoffeintrag durch verschieden geformte Schikanen und Stopfen Unregelmäßigkeiten. Daher ist eine Überprüfung der Ergebnisse auf einen geregelten Bioreaktorprozeß in jedem Fall erforderlich.

Mit dem im Rahmen der Optimierung für MH-Cr 6.3 erhaltenen Medium wurde bereits bei Schüttelkolbenkultivierungen eine Steigerung der optischen Dichte um einen Faktor von 3,2 erzielt. Während der Kultivierungen wurden aufgrund der schlechten Sauerstoffversorgung im Schüttelkolben von 5 g l⁻¹ nur 3,4 g l⁻¹ Glukose verbraucht. Bei gleichzeitiger Verwertung von Glukose und Aminosäuren ist zu Beginn der Kultivierung ein leichter pH-Abfall zu beobachten, der im weiteren Verlauf vermutlich durch die Freisetzung von NH₃ wieder ansteigt. Der End-pH-Wert der Schüttelkolbenkultivierungen lag schließlich wieder bei dem Ausgangswert von 7,6. Da der Organismus sehr schnell wächst und nur geringe pH-Schwankungen auftreten, wird auf eine pH-Regelung im Schüttelkolben verzichtet. Der mangelnden pH-Konstanz konnte im Rahmen der Bioreaktorkultivierung durch Titration mit NaOH und H₃PO₄ entgegengewirkt werden, so daß dieser Parameter im Scale up nicht mehr von Bedeutung war. Der in den durchgeführten Kultivierungen eingestellte pH-Wert entspricht dem pH-Wert der ursprünglichen Umgebung des Mikroorganismus, dem Wasser der Adria. Die bereits aus Untersuchungen von anderen Species dieser Gattung gewonnenen Erkenntnisse bezüglich eines großen pH-Toleranzbereiches von 6 bis 10 [Gauthier 1976a, Gauthier 1975] und für die von Bein isolierte Species von 6,2 bis 8,7 [Meyers *et al.* 1959], finden auch für den isolierten Stamm Gültigkeit. Verschiedene Experimente während dieser Arbeit haben gezeigt, daß auch bei MH-Cr 6.3 im pH-Bereich von mindestens 6,3 bis 9,3 Wachstum möglich ist, so daß kein Einfluß des pH-Wertes auf die Produktion der Biomasse zu erwarten wäre.

Temperaturoptimierung

Die im Rahmen der Temperaturuntersuchungen erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß im untersuchten Temperaturbereich von 4°C bis 37 °C Temperaturschwankungen zwischen 19°C

und 30°C keinen signifikanten Einfluß auf das Wachstum von MH-Cr 6.3 ausüben. In diesem Temperaturbereich ist jedoch ein Maximum des Wachstums bei 27°C zu beobachten. Diese Temperatur ist auch identisch mit der Isolierungstemperatur. Sowohl bei höheren Temperaturen (37°C) als auch bei niedrigeren Temperaturen ist eingeschränktes Wachstum von MH-Cr 6.3 möglich. Sogar bei 4°C wurde noch minimales Wachstum beobachtet.

Für marine Bakterien liegt die optimale Wachstumstemperatur mit 27°C relativ hoch. Je nach Herkunft (z.B. Nordsee oder Mittelmeer) wachsen marine Bakterien bevorzugt bei Temperaturen zwischen 18 und 25°C. Bei der Gattung *Pseudoalteromonas* ist dieses Temperaturverhalten jedoch nicht ungewöhnlich, das Temperaturoptimum von *Pseudoalteromonas citrea* befindet sich z.B. bei 28°C [Ivanova *et al.* 1998]. Weniger überraschend erscheint die Tatsache bei Berücksichtigung der Herkunft und der Jahreszeit der Isolatgewinnung. Da der Stamm im August aus der Adria isoliert wurde, war die Wassertemperatur im Vergleich zu anderen Monaten relativ hoch. Das bevorzugte Auftreten anderer Species während der Herbstmonate läßt vermuten, daß eine Anpassung an die Umweltbedingungen stattgefunden hat. Diese Beobachtung trifft jedoch nicht grundsätzlich auf alle Stämme dieser Gattung zu, da andererseits auch psychrophile Species bekannt sind [Bowman *et al.* 1997].

Im Rahmen der Temperaturuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß die spezifische Glukoseverbrauchsrate mit der Temperatur langsam ansteigt, ohne ein Maximum zu durchlaufen. Oberhalb von 30°C erfolgt jedoch ein sprunghafter Anstieg der spezifischen Glukoseverbrauchsrate. Die Glukose wird bei höheren Temperaturen, die nicht den Temperaturen in der natürlichen Umgebung (Meer) entsprechen, verstärkt zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels und nicht zum Aufbau der Biomasse verwendet.

Optimierte Bioreaktorkultivierung

Nach Abschluß der Optimierungsversuche im Schüttelkolben wurde ein Scale up im Bioreaktor durchgeführt. Bei der Übertragung der optimierten Wachstumsbedingungen auf den 50 l Maßstab mit optimaler Sauerstoffzufuhr und pH-Regelung konnte innerhalb von 8,5 h eine Biomassekonzentration von 15,91 g l⁻¹ erzielt werden ($\mu_{\max} = 0,62 \text{ h}^{-1}$). Im Gegensatz zu dem marinen Stamm *Arthrobacter* sp., der während einer Kultivierung im Bioreaktor nach 70 h eine Biomassekonzentration von 9,2 g l⁻¹ produziert [Passeri *et al.* 1990], liegt das Zeit-Ausbeute-Verhältnis bei MH-Cr 6.3 sehr günstig. Die exponentielle Phase verkürzte sich gegenüber reinem MB-Medium um 5,5 h, während sich die Zellmasse

um den Faktor 4,7 vermehrte. Somit konnte die im Rahmen der Schüttelkolbenkultivierungen erzielte Wachstumsoptimierung im Scale up nochmals um den Faktor 1,2 gesteigert werden. Ein wesentlicher Grund für diese Steigerung ist die verbesserte Sauerstoffversorgung durch Zufuhr größerer Luftmengen, die, wie aus den Untersuchungen zur Begasungsrate hervorgeht, einen großen Einfluß besitzt.

Eine Besonderheit der Bioreaktorkultivierung unter optimierten Bedingungen ist die Anreicherung der antimikrobiellen Fettsäuren im Überstand. Bereits vor Erreichen der stationären Phase sind die durch Zellyse freigesetzten antimikrobiellen Fettsäuren nachweisbar und steigen bis zum Ende der Kultivierung an. Weder in reinem MB-Medium im Bioreaktor noch in optimiertem Medium während der Schüttelkolbenkultivierungen konnten antimikrobielle Fettsäuren im zellfreien Überstand nachgewiesen werden.

Während der Bioreaktorkultivierung wurden 5 g l^{-1} Glukose innerhalb von 10 h vollständig verbraucht, während im Schüttelkolben nach 28,5 h erst $3,4 \text{ g l}^{-1}$ Glukose verbraucht waren. Die bevorzugte Verwertung anderer Substrate gegenüber Glukose geht deutlich aus der Bioreaktorkultivierung hervor. Eine positive Chemotaxis durch Asn oder andere Aminosäuren könnte eine Ursache dafür sein [Howaldt *et al.* 1991]. Innerhalb der ersten 5 h während des exponentiellen Wachstums mit maximaler Wachstumsrate wurden lediglich 20 % der Glukose verbraucht. Ausschließlich während des gleichzeitigen Verstoffwechsels von Asn, Arg, oder His und Glukose entstehen acide Metabolite, die einen pH-Abfall bewirken. Bei diesen Metaboliten, die an das Medium abgegeben werden, handelt es sich entweder um organische Säuren oder um eine Anhäufung von CO_2 , das als Kohlensäure einen pH-Abfall bedingt.

Einhergehend mit einem plötzlichen Anstieg des pH-Wertes in der zweiten zu beobachtenden Phase, bei reduziertem Sauerstoffverbrauch und reduzierter Kohlendioxidbildung wird Glycin in großen Mengen aus den Zellen geschleust. Möglicherweise wird durch Produktion von Glycin aus CO_2 und NH_4^+ die Zelle von überschüssigen Metaboliten befreit. Im allgemeinen wird bei Mikroorganismen ein intrazellulärer NH_4^+ -Spiegel von ca. 0,2 bis 0,3 mM aufrechterhalten. Unter C-limitierenden Bedingungen wird der N-Überschuß in Form von NH_4^+ bzw. NH_3 ausgeschieden [Köhler & Hofmann 1992], was zu einem pH-Anstieg führt. Eine C-Limitierung liegt hier jedoch nicht vor.

Optimierungsergebnisse

Tab. IV.4: Zusammenfassung der Optimierungsbedingungen.

Parameter:	Bedingungen:
Medium	MB-Medium + 3 % Hefeextrakt + 0,5 % Pepton + 0,5 % Glukose
Temperatur	27°C
Begasungsrate	0,2 v/vm
Kultivierungsgefäß	50 l Bioreaktor

Die Zusammenfassungen der Optimierungsbedingungen und -ergebnisse sind in Tab. IV.4 und Tab. IV.5 dargestellt. Mit Hilfe der aufgereinigten antimikrobiellen Fettsäurefraktion wurde eine Kalibrierung von Wirkstoffkonzentration und Hemmhofdurchmesser durchgeführt. Mit Hilfe der erhaltenen Kalibrationsgeraden wurden für alle Kultivierungen anhand der Hemmhofdurchmesser die maximalen Produktkonzentrationen ermittelt. Eine genauere Analyse der Wirkstoffmengen wäre unter Verwendung entsprechender Standards mittels GC-Messungen möglich.

Der Wechsel vom Schüttelkolben zum Bioreaktor führte unabhängig vom Medium zu einer Steigerung der Biomassekonzentration um einen Faktor von 1,2 bis 1,3. Die Kultivierungszeit bis zum Erreichen der stationären Phase verkürzte sich deutlich beim Übergang vom Schüttelkolben zum Bioreaktor. Für die Zunahme des Zellextraktes zeigte sich beim optimiertem Medium ebenfalls eine Steigerung um den Faktor 1,2; bei reinem MB-Medium liegen die Verhältnisse jedoch zugunsten der Bioreaktorkultivierung viel höher. Da die Rohextraktbestimmung bei den Schüttelkolbenkultivierungen nicht bei Erreichen der maximalen Biomassekonzentrationen sondern erst während der Absterbephase durchgeführt wurde, haben möglicherweise bereits erste Metabolitdegradationen stattgefunden.

Tab. IV.5: Übersicht der Optimierungsergebnisse.

	Schüttelkolben MB-Medium	Schüttelkolben MB-Medium optimiert	Bioreaktor MB-Medium	Bioreaktor MB-Medium optimiert
BTM [g l ⁻¹]	2,91	11,79	3,40	15,91
Kultivierungs- dauer [h] (bis stat. Phase)	21	28	14	8,5
μ_{\max} [h ⁻¹]	0,19	0,22	0,21	0,62
Zellrohextrakt [mg l ⁻¹]	80	650	400	750
<u>Produkt in den Zellen:</u>				
C16:1 [mg l ⁻¹]	12	274	51	287
C17:1 [mg l ⁻¹]	1,7	37	7	39
<u>Produkt im zellfreien Überstand:</u>				
C16:1 [mg l ⁻¹]	-	-	-	93
C17:1 [mg l ⁻¹]	-	-	-	12
spezif. Produktivität Q _P [mg _{Produkt} (g _{BTM} h) ⁻¹]	0,23	0,94	1,21	3,18

Der Einfluß des optimierten Kulturmediums auf die Dauer der exponentiellen Wachstumsphase ist vom Kultivierungssystem abhängig. Während bei Schüttelkolbenkultivierungen die exponentielle Wachstumsphase durch das optimierte Medium um 33 % verlängert wird, nimmt die Dauer der exponentiellen Wachstumsphase im Bioreaktor um 40 % ab. Diese konträren Tendenzen sind auf die unterschiedliche Sauerstoffversorgung beider Kultivierungen zurückzuführen. Unabhängig vom Kultivierungssystem stehen beim optimierten Medium ausreichend Substrate für das Bakterienwachstum zur Verfügung. Die

Verstoffwechselung der angebotenen Substrate kann jedoch nur bei ausreichender Sauerstoffversorgung mit hoher Geschwindigkeit erfolgen. Steht Sauerstoff nicht ausreichend zur Verfügung (Schüttelkoben, nicht optimierter Bioreaktor), wird nur die Wachstumsdauer bei gleichbleibender Geschwindigkeit verlängert. Diese Aussage wird auch durch die maximalen Wachstumsraten von $0,19 \text{ h}^{-1}$ (Schüttelkolben MB-Medium), $0,22 \text{ h}^{-1}$ (Schüttelkolben MB-Medium optimiert) und $0,21 \text{ h}^{-1}$ (Bioreaktor MB-Medium) gegenüber $0,62 \text{ h}^{-1}$ bei optimierter Sauerstoffzufuhr und optimiertem Medium bestärkt.

Die Mediumsoptimierung führte zu einer Steigerung der Biomassekonzentration um einen Faktor von 4,7 (Bioreaktor) und 4,0 (Schüttelkolben). Aus den Zellen und dem zellfreien Überstand wurden insgesamt Produktkonzentrationen von C16:1 380 mg l^{-1} und C17:1 51 mg l^{-1} erhalten, was im Vergleich zu reinem MB-Medium (Bioreaktor) eine Steigerung um einen Faktor von 7,5 bedeutet.

Die Mediums- und Verfahrensoptimierung vom Schüttelkolben mit MB-Medium zum optimierten Bioreaktor mit optimiertem Medium führte zu einem Anstieg der maximalen spezifischen Produktivität von $0,23 [\text{mg}_{\text{Produkt}} (\text{g}_{\text{BTM}} \text{ h})^{-1}]$ auf $3,18 [\text{mg}_{\text{Produkt}} (\text{g}_{\text{BTM}} \text{ h})^{-1}]$. Durch Mediumsoptimierung wurde die spezifische Produktbildung um einen Faktor von 4 gesteigert. Durch das Scale up mit optimierten Bedingungen wurde eine weitere Steigerung der spezifischen Produktbildung um einen Faktor von 3,4 erzielt, so daß insgesamt eine Steigerung der spezifischen Produktivität um einen Faktor von 13,8 erzielt wurde.

Fed-Batch-Bioreaktor

Nach Optimierung des Mediums und der Kultivierungsparameter sollte weiterhin eine Optimierung des Kultivierungsverfahrens erfolgen. Nachdem in den bisherigen Versuchen gezeigt werden konnte, daß die Produktion der antimikrobiellen Fettsäuren mit dem Wachstum gekoppelt ist, sollte in einem ersten Ansatz mit Hilfe einer Fed-Batch-Strategie die Wachstumsphase verlängert werden, um insgesamt eine höhere Produktmenge zu erzielen. Im Gegensatz zu Batch-Kulturen, bei denen das gesamte Substrat zu Beginn der Kultivierung zugesetzt wird, wird das Substrat beim Fed-Batch-Verfahren im Laufe der Kultivierung portionsweise hinzugefügt. Die Fed-Batch-Methode wird dann angewendet, wenn der repressive Effekt von schnell veratembaren Kohlenstoffquellen umgangen werden soll, die Viskosität des Mediums herabgesetzt werden soll, die Wirksamkeit toxischer

Mediumsbestandteile in Grenzen gehalten oder wenn das Stadium der Produktbildung so lange wie möglich ausgedehnt werden soll [Ward 1994].

Durch die Fed-Batch-Strategie konnte die Wachstumsphase bis zur 55. Stunde gegenüber 8,5 h in der Batch-Kultur ausgedehnt werden. Allerdings wurde innerhalb dieses Zeitraumes aufgrund einer niedrigen Wachstumsgeschwindigkeit nur eine maximale Biomassekonzentration von $12,42 \text{ g l}^{-1}$ gegenüber $15,91 \text{ g l}^{-1}$ bei der optimierten Batch-Kultivierung erzielt. Die niedrige Wachstumsgeschwindigkeit bei der Fed-Batch-Kultivierung kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Aufgrund einer starken Schaumbildung in den ersten 10 Kultivierungsstunden ist die optimale Sauerstoffversorgung der Zellen nicht gewährleistet gewesen, was auch der Verlauf der Gelöstsauerstoffkonzentration belegt (Daten nicht gezeigt). Erst nach Zugabe von Ucolub konnte die Schaumbildung unterdrückt werden. Weiterhin belegen die Verläufe der Aminosäurekonzentrationen, daß die hier gewählte Zudosage von Hefeextrakt nicht ausreichte, um die Kultur mit genügend Arginin zu versorgen. Es ist hier schon frühzeitig eine Substratlimitierung eingetreten. Diese Daten und ein Vergleich mit den anderen durchgeführten Bioreaktorkultivierungen belegen, daß das Vorhandensein der Aminosäure Arg ein wesentlicher Faktor für ein schnelles Wachstum von MH-Cr 6.3 darstellt.

Durch die Zudosage von Hefeextrakt steigen alle anderen Aminosäurekonzentrationen bis zur 10. Kultivierungsstunde an. Erst zu dem Zeitpunkt, an dem kein extrazelluläres Arg mehr vorhanden ist, werden Thr und Ser verstoffwechselt. Asn wird ab der 10. Stunde in gleichem Maße verstoffwechselt wie es zugeführt wird, so daß die extrazelluläre Konzentration im Verlauf der Kultivierung gleich bleibt. Die Verstoffwechslung der anderen Aminosäuren beginnt erst ab der 35. Kultivierungsstunde.

Anhand der Fed-Batch-Kultivierung können weiterhin Einblicke in den Stoffwechsel von MH-Cr 6.3, in das Zusammenspiel von Glukose- und Aminosäureverwertung, gewonnen werden. Die Steigerungen der Biomassekonzentrationen von MH-Cr 6.3 ist, wie der Vergleich der verschiedenen Bioreaktorkultivierungen in Abb. IV.4 zeigt, nur geringfügig von der Glukosekonzentration abhängig. Bei gleicher Glukosekonzentration wurde durch Variation der komplexen Mediumsbestandteile eine deutliche Steigerung der Biomassekonzentrationen erzielt. Glukose und Arg (auch Ser und Thr) werden gleichzeitig metabolisiert. In Anwesenheit von Glukose kann die Biomassekonzentration geringfügig gesteigert werden. Bei vollständigem Verbrauch dieser drei Aminosäuren wird bevorzugt Glukose (auch Asp als N-Quelle) aufgenommen und verwertet. Aufgrund der hohen

Zelldichte und der bevorzugten Aufnahme von Glukose gegenüber den noch vorhandenen extrazellulären Aminosäuren, ist während der Fed-Batch-Kultivierung nach Zugabe von Glukose eine sehr schnelle Abnahme der Glukosekonzentration zu beobachten. Nach vollständigem Glukose-Verbrauch werden anschließend die schlechter verwertbaren Aminosäuren metabolisiert.

Die Entwicklung der spezifischen Glukoseverbrauchsrate während der Kultivierung in MB-Medium + 5 g l⁻¹ Glukose und einer Zugabe von 5 g l⁻¹ Pepton nach 22 h bestätigt noch einmal diesen Zusammenhang. Zu Beginn der Kultivierung ist eine kontinuierliche Verringerung der spezifischen Glukoseverbrauchsrate bei sinkender Glukosekonzentration von 0,087 auf 0,021 [g_{Glukose} (g_{BTM} h)⁻¹] zu beobachten. Nachdem die Aminosäuren verbraucht sind, erfolgt ein plötzlicher Anstieg der spezifischen Glukoseverbrauchsrate auf 0,048 [g_{Glukose} (g_{BTM} h)⁻¹], der nach Zugabe von Pepton wieder schlagartig auf einen Wert von 0,008 absinkt, obwohl noch Glukose vorhanden ist.

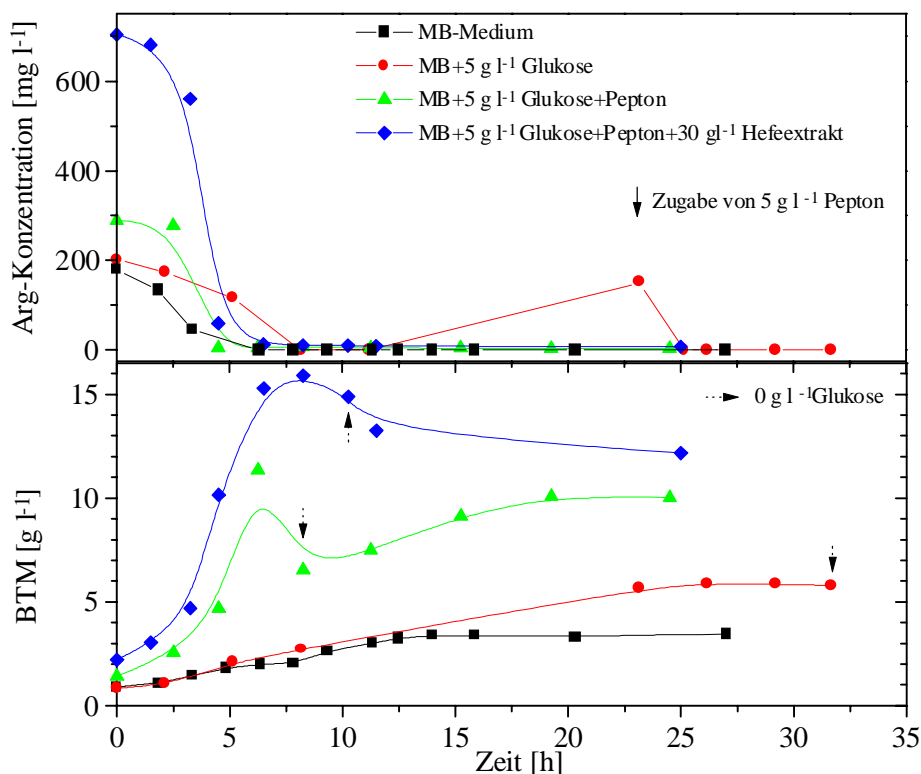


Abb. IV.4: Bioreaktorkultivierungen von MH-Cr 6.3 in verschiedenen Medien. Vergleich der extrazellulären Arg-Konzentrationen mit der Entwicklung der Biomassekonzentrationen bei verschiedenen Bioreaktorkultivierungen. Der schwarze gestichelte Pfeil in der unteren Graphik kennzeichnet den Zeitpunkt des vollständigen Glukoseverbrauchs.

Die erreichten Produktkonzentrationen der antimikrobiellen Fettsäuren von 60 mg l^{-1} C16:1 und 8 mg l^{-1} C17:1 entsprechen etwa den Produktkonzentrationen bei Batch-Kultivierungen in reinem MB-Medium. Wie das Wachstum so ist auch die Produktbildung im wesentlichen an das Vorhandensein von Arg gekoppelt. Nachdem Arg vollständig verbraucht ist, steigt auch die Produktkonzentration nur noch geringfügig an. Die geringen Produktkonzentrationen können mit der frühzeitigen Arg-Limitierung und dem Fehlen einer deutlichen exponentiellen Wachstumsphase erklärt werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß eine Fed-Batch-Strategie grundsätzlich eine Optimierungsmöglichkeit bei der Kultivierung von MH-Cr 6.3 darstellt. Die bei diesem ersten Versuch gewählten Anfangsbedingungen ($\text{MB} + 5 \text{ g l}^{-1}$ Glukose + 5 g l^{-1} Pepton) sollten jedoch bei einem zukünftigen Versuch dahingehend geändert werden, daß die optimierten Batch-Bedingungen ($\text{MB} + 5 \text{ g l}^{-1}$ Glukose + 5 g l^{-1} Pepton + 30 g l^{-1} Hefeextrakt) als Anfangsbedingungen für eine Fed-Batch-Kultivierung gewählt werden. Der Verlauf der Aminosäurekonzentrationen zeigt, daß eine Zudosage der Aminosäure Arg anstatt Hefeextrakt zu einer Verlängerung der exponentiellen Wachstumsphase und der damit gekoppelten Produktion von antimikrobiellen Fettsäuren führen sollte.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Screening nach bioaktiven Naturstoffen aus schwammassoziierten Mikroorganismen durchgeführt. Aus fünf verschiedenen Schwämmen konnten ca. 50 verschiedene Mikroorganismen isoliert und auf Produktion von antibakteriellen, fungiziden, algiziden und toxischen Wirkstoffen gescreent werden. Bei dem Screening zeichneten sich insbesondere zwei Bakterien durch auffällige antimikrobielle Eigenschaften aus, die im folgenden näher untersucht wurden.

Aus dem Schwamm *Mycale tunicata* wurde ein gramnegatives Bakterium isoliert, das als *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert wurde. Der Zellextrakt von *Ps. aeruginosa* zeigte antibakterielle Aktivitäten gegen grampositive Bakterien (MHK = 32 µg ml⁻¹), schwache fungizide Aktivitäten gegen *U. violacea* und *M. microspora* und algizide Wirkung gegen *C. fusca*. Der Wirkstoff konnte aus den Zellen isoliert und als Rhamnoselipid identifiziert werden.

Das zweite auffällige Bakterium MH-Cr 6.3 wurde aus dem Schwamm *Crella rosea* isoliert. Anhand verschiedener Charakterisierungsmerkmale war eine Zuordnung zur Gattung *Pseudoalteromonas* möglich. Aufgrund phylogenetischer Ähnlichkeiten der Nukleotidvollsequenz konnten Ähnlichkeiten von 99,8 % zu *Pseudoalteromonas piscicida* und 99,7 % zu *Pseudoalteromonas* Y festgestellt werden. Aus den Zellen des Bakteriums wurden Heptadecensäure (9c) und Hexadecensäure (9c) isoliert, die im Verhältnis von 1:7,4 antimikrobielle Aktivitäten gegen die Bakterien *B. megaterium* (IC₅₀ = 165 µg ml⁻¹), *S. aureus* (IC₅₀ = 30 µg ml⁻¹), *Ps. aeruginosa* (IC₅₀ = 20 µg ml⁻¹), den Pilz *U. violacea* und die Alge *C. fusca* besitzen. Weiterhin wurde eine Reduktion der Biolumineszenz von *Vibrio fischeri* beobachtet.

Neben den antimikrobiellen Fettsäuren wurden noch weitere Metabolite aus dem Zellextrakt von MH-Cr 6.3, die während des Wachstums produziert und in größeren Mengen akkumuliert werden, isoliert und charakterisiert. Es konnten die Substanzen Adenosin, Uridin, Desoxyadenosin und Desoxythymidin sowie zwei verschiedene β-Hydroxyfettsäuren identifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden zur Steigerung der Biomassekonzentration und der Produktausbeuten des marinen Bakteriums *Pseudoalteromonas* spec. MH-Cr 6.3

Optimierungen der Zusammensetzung des verwendeten Mediums sowie auch verschiedener Kultivierungsparameter (Temperatur, Begasungsrate, Kultivierungsgefäß) durchgeführt. Der Versuch, die Nährstoffversorgung mit Hilfe einer Fed-Batch-Strategie zu optimieren, ermöglichte einen Einblick in die bevorzugte Verwertung der einzelnen komplexen Mediumsbestandteile. Dabei zeigte sich, daß neben der Sauerstoffversorgung die Arginin-konzentration der wichtigste Faktor für unlimitedes Wachstum von MH-Cr 6.3 ist.

Im Rahmen der Mediumsoptimierung wurde bei Zusatz von Hefeextrakt, Pepton und Glukose zu Marine Broth für die Kultivierung im Schüttelkolben eine Steigerung der Biomassekonzentration und auch der spezifischen Produktivität um den Faktor 4 erzielt. Die optimale Wachstumstemperatur liegt für MH-Cr 6.3 bei 27°C. Daneben erwies sich das Wachstum von MH-Cr 6.3 in besonderem Maße von der Sauerstoffversorgung abhängig. Ein optimales Wachstum wurde nur unter geregelten Bedingungen im Bioreaktor bei einer Begasungsrate von 0,2 oder 0,3 v/vm erzielt. Die maximale Wachstumsrate beträgt unter optimierten Bedingungen 0,62 h⁻¹. Nach Durchführung des Scale up im Bioreaktor wurde die spezifische Produktivität nochmals um einen Faktor von 3,4 gesteigert, so daß für den Prozeß insgesamt eine Steigerung der spezifischen Produktivität um 13,8 erreicht wurde.

VI. Literatur

Abel, E., Kohlmeyer, J., Kusel, H., Matthes, D., Riedl, R., Rossi, L., v. Salvini-Plawen, L., and Sarà, M. In: Fauna und Flora des Mittelmeeres. Ein systematischer Meeresführer für Biologen und Naturfreunde, 3rd edn. (Hrsg.: Prof. Dr. Rupert Riedl Inst. f. Zoologie der Universität Wien) Hamburg und Berlin: Verlag Paul Parey 1983

Abu, G. O., and Colwell, R. R. (1994) Glucose Metabolism and Polysaccharide Accumulation in the Marine Bacterium, *Shewella colwelliana*.
World J. of Microbiol. & Biotech. **10**, 543-546

Anthony, W. L. *et al.* (1963) Separation of Equol from Oestrogens by Thin-Layer Chromatography.
J. Chromatog. **13**, 570-572

Arino, A., Marchal, R., and Vandecasteele, J.-P. (1996) Identification and Production of a Rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* Species.
Appl. Microbial. Biotechnol. **45**, 162-168

Austin, B. (1988) Marine Microbiology.
British Library cataloguing in publication data. 68-174

Austin, B. (1989) Novel Pharmaceutical Compounds from Marine Bacteria.
J. Appl. Bacteriol. **69**, 461-470

Baaß, A.-C. Screening nach antibiotischen marinen Naturstoffen und Quantifizierung ihrer antimikrobiellen Wirkung unter Einbeziehung bekannter Antibiotika.
Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig 1998

Barth, D. (1997) Strukturaufklärung und Totalsynthese von Jawsamycin.
Naturw. Rdsch. **1**, 30

Baumann, P., and Baumann, L. The Marine Gram-Negativ Eubacteria: Genera Photobacterium, Beneckea, Alteromonas, Pseudomonas, and Alcaligenes. In: The Prokaryotes (Hrsg.: M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Trüper, A. Balows und H. G. Schlegel) Vol. 2, Berlin-Heidelberg: Springer Verlag 1981, S. 1302-1331

Baumann P., Gauthier M. J., and Baumann L.. Genus Alteromonas Baumann, Baumann, Mandel and Allen 1972, 418. ^{AL}. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Hrsg.: N. R. Krieg), Vol. 1, London: Williams & Wilkins Baltimore 1984, S. 342-352

Bein, S. J. (1954) A Study of Certain Chromogenic Bacteria Isolated From "Red Tide" Water with a Description of a New Species.
Bull. Marine Sci. Gulf Caribbean **4**, 110-119

Bradford, M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.
Anal. Biochem. **72**, 248-254

- Bernan, V. B., Montenegro, D. A., Korshalla, J. D., Maiese, W. M., Steinberg, D. A., and Greenstein, M. (1994) Bioxalomycins, New Antibiotics Produced by the Marine *Streptomyces* sp. LL-31F508: Taxonomy and Fermentation. *J. of Antibiotics* **47**, 1417-1424
- Bindseil, K. U. (1996) Naturstoffchemie. Neue Wirkstoffe - neue Mechanismen. *BIOforum* **9**, 369-372
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Brown, M. V., Nichols, D. S., and McMeekin, T. A. (1997) Diversity and Association of Psychrophilic Bacteria in Antarctic Sea Ice. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3068-3078
- Brandly, S. E., and Molinski, T. F. (1995) Brominated Acetylenic Fatty Acids from *Xestospongia* sp., a Marine Sponge-Bacteria Association. *Tetrahedron* **51**, 7667-7672
- Buck, J. D., and Meyers, S. P. (1966) In vitro Inhibition of *Rhodotorula minuta* by a Variant of the Marine Bacterium, *Pseudomonas piscicida*. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* **13**, 171-180
- Buck, J. D., Meyers, S. P., and Leifson, E. (1963) *Pseudomonas* (Flavobacterium) *piscicida* Bein Comb. Nov. *J. Bacteriol.* **86**, 1125-1126
- Carballeira, N. M., Reyes, E. D., Sostre, A., Rodríguez, J. L., and González, F. A. (1997) Identification of the Novel Antimicrobial Fatty Acid (5Z,9Z)-14-Methyl-5,9-pentadecadienoic Acid in *Eunicea succinea*. *J. Nat. Prod.* **60**, 502-504
- Chen, C., Imamura, N., Nishijima, M., Adachi, K., Sakai, M., and Sano, H. (1996) Halymecins, New Antimicroalgal Substances Produced by Fungi Isolated from Marine Algae. *J. Antibiotics* **49**, 998-1005
- Claeson, P., and Bohlin, L. (1997) Some Aspects of Bioassay Methods in Natural-Product Research Aimed at Drug Lead Discovery. *TIBTECH* **15**, 245-248
- de Vries, D. J., and Hall, M. R. (1994) Marine Biodiversity as a Source of Chemical Diversity. *Drug Development Research* **33**, 161-173
- de Long, E. F. (1997) Marine Microbial Diversity: the Tip of the Iceberg. *TIBTECH* **15**, 203-207
- Doser, M., und Planck, H. (1999) Zelluläre Testsysteme für Biomaterialien. *Bioforum* **1-2**, 14-16
- Doshida, J., Hasegawa, H., Onuki, H., and Shimidzu, N. (1996) Exophilin A, a New Antibiotic from a Marine Microorganism *Exophiala pisciphila*. *J. Antibiotics* **49**, 1105-1109

- Eberz, G., Rast, H.-G., Burger, K., Kreiss, W., Weisemann, C. (1996) Bioactivity Screening by Chromatography-Bioluminescence Coupling.
Chromatographia **43**, 5-9
- Enei, H. Purine Nukleoside Fermentation. In: From Fermentation to New Biotechnology (Hrsg.: T. Tochikura) Tokyo: Japan Bioindustry Association 1988, S. 135-147
- Faulkner, D. J. (1977) Marine Natural Products: Metabolites of Marine Invertebrates.
Nat. Prod. Rep. **1**, 551-598
- Faulkner, D. J. (1984) Interesting Aspects of Marine Natural Products Chemistry.
Tetrahedron **33**, 1421-1443
- Faulkner, D. J. (1998) Marine Natural Products.
Nat. Prod. Rep. 113-158
- Faulkner, D. J., He, H.-Y., Unson, M. D., and Bewley, C. A. (1993) New Metabolites from Marine Sponges: Are Symbionts Important?
Gazzetta Chimica Italiana **123**, 301-307
- Fawcett, J. K., and Scott, J. E. (1960) A Rapid and Precise Method for the Determination of Urea.
J. Clin. Path. **13**, 156-159
- Fenical, W. (1993) Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource.
Chem. Rev. **93**, 1673-1683
- Fenical, W. (1997) New Pharmaceuticals from Marine Organisms.
TIBTECH **15**, 339-341
- Fenical, W., and Jensen, P. R. Marine Microorganisms: A New Biomedical Resource. In: Pharmaceutical and Bioactive Natural Products (Hrsg.: D. H. Attaway and O. R. Zaborsky) Plenum Press New York 1993; Vol. 1, S. 419-457
- Ferguson, R. L., Buckley, E. N., and Palumbo, A. V. (1984) Response of Marine Bacterioplankton to Differential Filtration and Confinement.
Appl. Environ. Microbiol. **47**, 49-55
- Freese, A., Reichenbach, H., and Lünsdorf, H. (1997) Further Characterization and *In Situ* Localization of Chain-like Aggregates of the Gliding Bacteria *Myxococcus fulvus* and *Myxococcus xanthus*.
J. Bacteriol. **179**, 1246-1252
- Freese, E., Sheu, C. W., and Galliers, E. (1973) Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives.
Nature **241**, 321-325
- Gambacorta, A., Gliozzi, A., and de Rosa, M. In: World J. Microbiol. Biotechnol. Amsterdam: Elsevier 1993, S. 261

- Gauthier, G., Gauthier, M., and Christen, R. (1995) Phylogenetic Analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations. *Int. J. System. Bacteriol.* **45**, 755-761
- Gauthier, M. J. (1975) Taxonomic Position and Seasonal Variations in Marine Neritic Environment of Some Gram-negative Antibiotic-Producing Bacteria. *J. General. Microbiol.* **87**, 211-218
- Gauthier, M. J. (1976a) *Alteromonas rubra* sp. nov., a New Marine Antibiotic-Producing Bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **26**, 459-466
- Gauthier, M. J. (1976b) Modification of Bacterial Respiration by a Macromolecular Polyanionic Antibiotic Produced by a Marine *Alteromonas*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**, 361
- Gauthier, M. J. (1976c) Morphological, Physiological, and Biochemical Characteristics of some Violet-Pigmented Bacteria Isolated from Seawater. *Can. J. Microbiol.* **22**, 138-149
- Gauthier, M. J. (1977) *Alteromonas citrea*, a New Gram-Negative, Yellow-Pigmented Species from Seawater. *Int. J. System. Bacteriol.* **27**, 349-354
- Gauthier, M. J., and Breittmayer, V. A. (1979) A New Antibiotic-Producing Bacterium from Seawater: *Alteromonas aurantia* sp. nov.. *Int. J. System. Bacteriol.* **29**, 366-372
- Gauthier, M. J., and Breittmayer, V. A. The Genera *Alteromonas* and *Marinomonas*. In: The Prokaryotes; A Handbook on the Biology of Bacteria Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications (Hrsg.: A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. H. Tuo, K.-H. Schleiter) Vol. 3, Springer Verlag 1992, S. 3047-3070
- Gauthier, M. J., and Flatau, G. N. (1976) Antibacterial Activity of Marine Violet-Pigmented *Alteromonas* with Special Reference to the Production of Brominated Compounds. *Can. J. Microbiol.* **22**, 1612-1619
- Gavrilovic, L., O'Brien, R. W., and Sanders, R. L. (1982) Secretion of Amylase by the Marine Bacterium *Alteromonas rubra*. *Aust. J. Biol. Sci.* **35**, 111-124
- Gerber, N. N., and Gauthier, M. J. (1979) New Prodigiosin-Like Pigment from *Alteromonas rubra*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1176-1179
- Gerth, K., Bedorf, N., Höfle, G., Irschik, H., and Reichenbach, H. (1996) Epothilons A and B: Antifungal and Cytotoxic Compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacterium). *J. Antibiotics* **49**, 560-563

Gerwick, W. H., Proteau, P. J., Nagle, D. G., Hamel, E., Blokhin, A., and Slate, D. L. (1994) Structure of Curacin A, a Novel Antimitotic, Antiproliferative, and Brine Shrimp Toxic Natural Product from the Marine Cyanobakterium *Lyngba majuscula*. *J. Org. Chem.* **59**, 1243-1245

González, J. E., and Negulescu, P. A. (1998) Intracellular Detection Assays for High-Throughput Screening. *Pharm. Biotech.* 624-631

Gottschalk, G. The Importance of Superoxide Dismutase. In: Bacterial Metabolism. New York: Springer Verlag 1986, S. 34-35

Gräfe, U., Dornberger, K., and Fleck, W. F. (1989) Approaches to new Microbial Metabolites with Nonclassical Mode of Action. S. 113-135

Hansen, A. J., Weeks, O. B., and Colwell, R. R. (1965) Taxonomy of *Pseudomonas piscicida* (Bein) Buck, Meyer, and Leifson. *J. Bacteriol.* **89**, 752-761

Hartree, E. F. (1972) Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response. *Anal. Biochem.* **48**, 422-427

Hartwig, W., und Henkel, T. (1994) Die Bedeutung von Naturstoffen in der modernen Pharmaforschung. *BIOforum* **17**, 170-172

Harwood, J. L., and Padley, F. B. In: The Lipid Handbook (Hrsg.: F. D. Gunstone) London: Chapman & Hall 1994

Hatton, P. V., and Kinderleder, J. L. (1991) Toxicity of Medium Chain Fatty Acids to *Penicillium crustosum* Thom and their Detoxification to Methyl Ketones. *J. Appl. Bacteriol.* **70**, 401-407

Hibino, W., Kadotani, Y., Kominami, M., and Yamane, T. (1993) Three Automated Feeding Strategies of Natural Complex Nutrients Utilizing On-Line Turbidity Values in Fed-Batch Culture: A Case Study on the Cultivation of a Marine Microorganism. *J. Ferment. Bioengin.* **75**, 443-450

Hill, D. C., Wrigley, S. K., and Nisbet, L. J. Novel Screen Methodologies for Identification of New Microbial Metabolites with Pharmacological Activity. In: Bioprocess and Algae Reactor Technology, Apoptosis. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag 1998, S. 73-121

Hommel, R. K., and Ratledge, C. Biosynthetic Mechanisms of Low Molecular Weight Surfactants and Their Precursor Molecules. In: Biosurfactants, Production, Properties, Applications (Hrsg.: N. Kosaric) New York: Marcel Dekker 1993, S. 3-63

Howaldt, M., Otto, M. K., Schnepfle, H., Sonnleitner, S. W., und Walitza, E. Bioprozeßtechnik (Hrsg.: H. Chmiel) Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1991

- Imai, I., Ishida, Y., Sakaguchi, K., and Hata, Y. (1995) Algicidal Marine Bacteria Isolated from Northern Hiroshima Bay, Japan.
Fisheries Science **61**, 628-636
- Imamura, N., Nishijima, M., Takahide, T., Adachi, K., Sakai, M., and Sano, H. (1997) New Anticancer Antibiotics Pelagiomicins, Produced by a New Marine Bacterium *Pelagiobacter variabilis*.
J. Antibiotics **50**, 8-12
- Ivanova, E. P., Kiprianova, E. A., Mikhailov, V. V., Levanova, G. F., Garagulya, A. D., Gorshkova, N. M., Vysotskii, M. V., Nicolau, D. V., Yumoto, N., Taguchi, T., and Yoshikawa, S. (1998) Phenotypic Diversity of *Pseudoalteromonas citrea* from Different Marine Habitats and Emendation of the Description.
Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 247-256
- Jacin, H. *et al.* (1965) Separation of Carbohydrates on Borate-Impregnated Silica Gel G Plates.
J. Chromatog. **18**, 170-173
- Jayatilake, G. S., Thornton, M. P., Grimwade, J. E., and Baker, B. J. (1995) Metabolites from an Antarctic Sponges-Associated Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*.
J. Nat. Prod. **59**, 293-296
- Jensen, P. R., and Fenical, W. (1994) Strategies for the Discovery of Secondary Metabolites from Marine Bacteria: Ecological Perspectives.
Annu. Rev. Microbiol. **48**, 559-584
- Jensen, P. R., and Fenical, W. (1996) Marine Bacterial Diversity as a Resource for Novel Microbial Products.
J. Ind. Microbiol. **17**, 346-351
- Kato, J., Amie, J., Murata, Y., Kuroda, A., Mitsutani, A., and Ohtake, H. (1998) Development of a Genetic Transformation System for an Alga-Lysing Bacterium.
Appl. Environ. Microbiol. **64**, 2061-2064
- Kell, D. (1999) Screensavers: Trends in High-Throughput Analysis.
TIBTECH. **17**, 89-91
- Kern, F. G. (1997) Biolumineszenz-Detektor für Bioaktivität in der Chromatographie.
BIOforum **1-2**, 18-20
- Kinderleder, J. L., and Lund, B. M. (1992) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Hexanoic and Octanoic Acids.
Lett. Appl. Microbiol. **14**, 271-274
- Kobayashi, J., and Ishibashi, M. (1993) Bioactive Metabolites of Symbiotic Marine Micro-organisms.
Chem. Rev. **93**, 1753-1769

Koch, C., und Neumann, T. (1997) Der Naturstoff-Pool. Ein neuartiges Konzept zur Wirkstoffsuche bringt Wirtschaft und Wissenschaft zusammen.
Biospektrum **1**, 43-45

Koch, H. P. (1992) Der Hefe-Test: Eine Alternativmethode zur Bestimmung der akuten Toxizität von Arzneistoffen und Umweltchemikalien.
Pharmazie **47**, 531-537

Kohama, Y., Suda, T., Iida, K., Mimura, T., Kamimura, K., Yamaoka, Y., Tsujibo, H., Inamori, Y., Imada, C., and Okami, Y. (1996) Isolation of Immunosuppressive Phospholipids from Marine Bacteria.
J. Mar. Biotechnol. **4**, 131-137

Köhler, M., und Hofmann, K. Grundriß der Biotechnologie. In: Grundlagen und ausgewählte Verfahren. München: Carl Hanser Verlag 1992

König, G. M., and Wright, A. D. Das Potential der Cyanobakterien als Produzenten innovativer Naturstoffe (Vortrag). In: Aktuelle Entwicklung in der Naturstoffforschung (Hrsg.: 10. Irseer Naturstofftage der Dechema e.V.) 25.-27.03.1998a

König, G. M., and Wright, A. D. (1998b) Wirkstoffe aus marinen Organismen.
P. Z. **48**, 4153-4161

Kuninaka, A. Fermentative Production of Nucleosides and Related Compounds. In: Biotechnology, Products of Primary Metabolism (Hrsg.: H.-J. Rehm, G. Reed and A. Püker) Vol. 6 VCH 1996

Lang, S., and Wullbrandt, D. (1999) Rhamnose Lipids - Biosynthesis, Microbial Production and Application Potential.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **51**, 22-32

Lang, S., Katsiwela, E., and Wagner, F. (1989) Antimicrobial Effects of Biosurfactants.
Fat. Sci. Technol. **9**, 363-366

Lemos, M. L., Toranzo, A. E., and Barja, J. L. (1985) Antibiotic Activity of Epiphytic Bacteria Isolated from Intertidal Seaweeds.
Microb. Ecol. **11**, 149-164

Lindel, T. (1998) Marine Naturstoffe am Great Barrier Reef.
Nachr. Chem. Tech. Lab. **46**, 1175-1177

Lovejoy, C., Bowman, J. P., and Hallegraeff, G. M. (1998) Algicidal Effects of a Novel Marine *Pseudoalteromonas* Isolate (Class Proteobacteria, Gamma Subdivision) on Harmful Algal Bloom Species of the Genera *Chattonella*, *Gymnodium*, and *Heterosigma*.
Appl. Environ. Microbiol. **64**, 2806-2813

Lowry, O. H., Rosebrought, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagenz.
J. Biol. Chem. **193**, 265-275

- Lümmen, P. (1988) Bakterielle Biolumineszenz: Biochemie, Physiologie und Molekulargenetik.
Forum Mikrobiol. **10**, 428-434
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. In: Biology of Microorganisms, 8th edn (Hrsg.: T. D. Brock) U. S. A.: Prentice Hall International, Inc. 1997
- Mandel, M., Weeks, O. B., and Colwell, R. R. (1965) Desoxyribonucleic Acid Base Composition of *Pseudomonas piscicida*.
J. Bacteriol. **90**, 1492-1493
- Mellor, F., God, R., Bindseil, K. U., und Gumm, H. (1997) Vollautomatische Isolierung von Naturstoffen. *GIT Spezial Chromatographie* **1**, 19-22
- Meyer, S. P., Baslow, M. H., Bein, S. J., and Marks, E. (1959) Studies of *Flavobacterium piscicida* Bein.
J. Bacteriol. **78**, 225-230
- Mouloungui, Z., Rakotondrazafy, V., Peyrou, G., Gachen, C., and Eychenne, V. (1998) Pure Monoglycerides for Industrial Applications.
Agra-Food-Industry Hi-Tech. **9**, 10-14
- Müller, W. E. G., Diehl-Seifert, B., Sobel, C., Bechtold, A., Kijajic, Z., and Dorn, A. (1986) Sponge Secondary Metabolites: Biochemical and Ultrastructural Localization of the Antimitotic Agent Avarol in *Dysidea avara*.
J. Histochem. Cytochem. **34**, 1687-1690
- Müller, W. E. G., und Schröder, H. C. (1997) Bioaktive Substanzen aus Schwämmen: Gene weisen den Weg bei der Suche nach neuen Arzneimitteln.
Biologie in unserer Zeit **27**, 389-398
- Muttzall, K. Mikrobielle Reaktionen. In: Modellierung von Bioprozessen, Behr's Verlag GmbH 1994, S. 248-250
- Nair, S., and Simidu, U. (1987) Distribution and Significance of Heterotrophic Marine Bacteria with Antibacterial Activity.
Appl. Environ. Microbiol. **53**, 2957-2962
- Näveke, R., und Tepper, K. P. Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden. Stuttgart: G. Fischer Verlag 1986
- Nichols, D., and Russel, N. J. (1996) Fatty Acid Adaptation in an Antarctic Bacterium-Changes in Primer Utilization.
Microbiol. **142**, 747-754
- Nishiyama, T., Nakamatsu, T., and Maeda, O. (1993) Adenosine Production by an Adenine Revertant Derived from an Inosine Producer.
Nippon Nogei Kagaku Kaishi. **67**, 843-847

Normausschuß Medizin (1989) Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Bouillon-Dilutionsmethode (Makrodilution). In: DIN 58 940 Teil 5 (Hrsg.: Normenausschuß Medizin im Institut für Normung e.V.)

Normausschuß Wasserwesen (1992) Leuchtbakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien Erweiterung des Verfahrens DIN 38412 - L34 (L341), Teil 341 (Hrsg.: Normausschuß Wasserwesen im Deutschen Institut für Normung e.V.)

Passeri, A., Schmidt, M., Haffner, T., Wray, V., Lang, S., and Wagner, F. (1992) Marine Biosurfactants. IV. Production, Characterization and Biosynthesis of an Anionic Glucose Lipid from the Marine Bacterial Strain MM1.
Appl. Microbiol. Biotechnol. **37**, 281-286

Pathirana, C., Jensen, P. R., and Fenical, W. (1992) Marinone and Debromomarinone: Antibiotic Sesquiterpenoid Naphthquinones of a New Structure Class from a Marine Bacterium.
Tetrahedron Lett. **33**, 7663-7666

Proksch, P., und Schupp, P. (1996) Chemische Ökologie Mariner Invertebraten.
BIOforum **1-2**, 22-26

Rinehart, K. L. *et al.* (1990) Bioactive Compounds from Aquatic and Terrestrial Sources.
J. Nat. Prod. **53**, 771

Russell, N. J. Molecular Adaptations in Psychrophilic Bacteria: Potential for Biotechnological Applications. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology: Biotechnology of Extremophiles. Berlin-Heidelberg: Springer; 1998

Sawabe, T., Makino, H., Tatsumi, M., Nakano, K., Tajima, K., Iqbal, M. M., Yumoto, I., Ezura, Y., and Christen, R. (1998) *Pseudoalteromonas bacteriolytica* sp. nov., a Marine Bacterium that is the Causative Agent of Red Spot Disease of *Laminaria japonica*.
Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 769-774

Schlegel, H. G. Allgemeine Mikrobiologie, 7th edn. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 1992

Schmidt, I., Sattler, I., Grabley, S., und Thiericke, R. (1999) Naturstoffe im Hochdurchsatz-Screening. *Bioforum* **1-2**, 17-20

Sears, M. A., Gerhart, D. J., and Rittschof, D. (1990) Antifouling Agents from Marine Sponge.
J. Chem. Ecol. **16**, 791-799

Shigemori, H., Bae, M.-A., Yazawa, K., Sasaki, T., and Kobayashi, J. (1992) Alteramine A, a New Tetracyclic Alkaloid from a Bacterium *Alteromonas* sp. Associated with the Marine Sponge *Halichondria okadai*.
J. Org. Chem. **57**, 4317-4320

- Shiozawa, H., Shimada, A., and Takahashi, S. (1997) Thiomarinols D, E, F and G, New Hybrid Antimicrobial Antibiotics Produced by a Marine Bacterium; Isolation, Structure, and Antimicrobial Activity.
J. Antibiotics **50**, 449-452
- Stahl, E., and Kaltenbach, U. (1961)
J. Chromatog. **5**, 351
- Stierle D. B., and Stierle A. A. (1992) Pseudomonic Acid Derivaties from a Marine Bacterium.
Experientia **48**, 1165-1169
- Stryer L. Biochemie, 4th edn. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 1995
- Suzuki, S. (1984) Nucleic Acid-Related Antibiotics.
Hakko to Kogyo **42**, 847-858
- Svetashev, V. I., Yysotskii, M. V., Ivanova, E. P., and Mikhailov, V. V. (1995) Cellular Fatty Acids of *Alteromonas* Species.
System. Appl. Microbiol. **18**, 37-43
- Syldatk, C. Mikrobielle Bildung und Charakterisierung grenzflächenaktiver Rhamnolipide aus *Pseudomonas* spec. DSM 2874
Dissertation, Technische Universität Braunschweig 1984
- Syldatk, C., Lang, S., and Wagner, F. (1985) Chemical and Physical Characterization of Four Interfacial-Active Rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 Grown on n-Alkanes.
Z. Naturforsch. **40c**, 51-60
- Trischman, J. A., Tapiolas, D. M., Jensen, P. R., Dwight, R., and Fenical, W. (1994) Salinamides A and B: Anti-Inflammatory Depsipeptides from a Marine Streptomycete.
J. Am. Chem. Soc. **51**, 757-758
- Vera, J., Alvarez, R., Murano, E., Slebe, J. C., and Leon, O. (1998) Identification of a Marine Agarolytic *Pseudomonas* Isolate and Characterization of Its Extracellular Agarase.
Appl. Environ. Microbiol. **64**, 4378-4383
- Wagner-Döbler, I. Mikrobielle Biodiversität-ewiges Eis, heiße Quellen und ribosomale Gene (Vortrag). In: Aktuelle Entwicklung in der Naturstoffforschung (Hrsg.: 10. Irseer Naturstofftage der Dechema e.V.) 25.-27.03.1998
- Ward, O. P. Bioreaktionen Prinzipien, Verfahren, Produkte. Berlin-Heidelberg: Springer Verlag 1994
- Weeks, O. B., Beck, S. M., Thomas, M. D., and Isenberg, H. D. (1962) Pigment of *Flavobacterium piscicida*.
J. Bacteriol. **84**, 1182
- Weiner, R. M. (1997) Biopolymers from Marine Prokaryotes.
Marine Biotech. **15**, 390-394

- Yakimov, M. M., Golyshin, P. N., Lang, S., Abraham, W. R., Lünsdorf, H., and Timmis, K. N. (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., spec. nov., a new, Hydrocarbondegrading and Surfactant-Producing Marine Bacterium.
Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 339-348
- Yokoyama, A., and Miki, W. (1995) Isolation of Myxol from a Marine Bacterium *Flavobacterium* sp. Associated with a marine Sponge.
Fisheries Science **61**, 684-686
- Zieseniss, K., und Grabert, E. (1995) LUMISTox Leuchtbakterientest Bestimmung der chronischen Toxizität.
Bioforum **18**, 455-457

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BTM	Biotrockenmasse
BSA	Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dünnschichtchromatogramm
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
FAB	Fast Atom Bombardment
FMNH ₂	reduzierte Form von Flavinmononukleotid
FT	Fourier-Transformation
GC	Gaschromatographie
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie
IC	<i>inhibition concentration</i>
ID	Identifizierungszahl
Ile	Isoleucin
IR	Infrarot
Kap.	Kapitel
LD	letale Dosis
Leu	Leucin
log	Logarithmus
Lys	Lysin
MB	Marine Broth
Met	Methionin
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
MS	Massenspektroskopie
neg.	negativ
NB	Nutrient Broth
NMR	kernmagnetische Resonanz
NP	normal Phase
RNA	Ribonukleinsäure
Phe	Phenylalanin
pos.	positiv
Pro	Prolin

Ser	Serin
spezif.	spezifisch
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RP	reverse Phase
stat.	stationär
Tab.	Tabelle
Thr	Threonin
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Valin	Valin
Verd.	Verdünnung
Vgl.	Vergleich
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

2. Nukleotidsequenz von MH-Cr 6.3

780 Nukleotide der 16S rRNA (Teilsequenz) von *Pseudoalteromonas spec. MH-Cr 6.3*:

```

      10      20      30      40      50      60
ATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAT

      70      80      90     100     110
TTCTAGCTTGCTAGAA--GATGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACATGC

120      130      140      150      160      170
CTTGAGGTGGGGGACAACCATTGGAAACGACGGCTAATACCGCATGATGTCTACGGACCA

180      190      200      210      220      230
AAGGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGACTGGCCCAAGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGT

240      250      260      270      280      290
AAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAA

300      310      320      330      340      350
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC

360      370      380      390      400      410
AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCA

420      430      440      450      460      470
GTCAGGAGGAAAGGTTAGTAGTTAATACCTGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGC

480      490      500      510      520      530
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAAT

540      550      560      570      580      590
TACTGGGCGTAAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTA

600      610      620      630      640      650
ACCTGGGAACTGCATTTCTGAAGTGGCAAAGTACAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTCA

660      670      680      690      700      710
GGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCACCTG

720      730      740      750      760      770
GGTCAACACTGACGCTCATGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG

```

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Marén Hüners
Geburtsdatum und -ort: 15.02.1968, Uelzen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

08. 1974 - 07. 1978 Grund- und Hauptschule Suderburg
08. 1978 - 07. 1984 Schiller Realschule Uelzen
08. 1984 - 07. 1987 Fachgymnasium Hauswirtschaft Lüneburg

Berufsausbildung:

08. 1987 - 07. 1990 Ausbildung zur Milchwirtschaftliche Laborantin, Uelzena -
Milchwerke eG, Uelzen

Berufstätigkeit:

07. 1990 - 09. 1990 als Milchwirtschaftliche Laborantin, Uelzena Milchwerke eG,
Uelzen

Hochschulstudium:

10.1990 - 04.1996 Studium der Chemie an der Universität Hannover
11.1995 - 04.1996 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie der Universität
Hannover

Promotion:

seit 01.08.1996 Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemie und
Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig
(angestellt als wissenschaftliche Mitarbeiterin)

Allgemein wissenschaftliche Publikationen:

Kretzmer, G., Rössler, B., Hüners, M., Lübben, H., and Reich, T., Temperature a Factor Influencing Cell Behaviour. In: Animal Cell Technology: From Vaccines to Genetic Medicine, Proceedings of the 14th meeting of ESACT, (Hrsg.: M. J. T. Carrondo, B. Griffiths and J. L. P. Moreira), Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers 1997, S. 319-323